

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## Contribution à l'étude de la spirillose des poules

PAR LE D<sup>r</sup> C. LEVADITI.

---

(Laboratoire de M. Metchnikoff)

---

Marchoux et Salimbeni<sup>1</sup> ont décrit récemment, dans ces *Annales* une maladie qui sévit chez la poule et qui est provoquée par un spirille particulier. Cette maladie offre plus d'une analogie avec la spirillose des oies, étudiée par Sakharoff<sup>2</sup>, Gabritschewsky<sup>3</sup> et Cantacuzène<sup>4</sup>. Elle est caractérisée par sa courte durée, par la crise, ou plutôt par la lyse qui met fin à la pullulation des spirilles dans le sang, et par l'immunité durable qui succède à l'infection, lorsque l'animal guérit. L'étude de cette maladie présente un grand intérêt, étant donné qu'elle permet de préciser la nature intime de certains phénomènes morbides que l'on rencontre dans la pathologie humaine, en particulier dans la fièvre récurrente. Aussi avons-nous été heureux de pouvoir l'entreprendre, grâce à la bienveillance de M. Marchoux, qui a mis à notre disposition le virus apporté de Rio-de-Janeiro, et qui nous a communiqué les résultats de ses recherches antérieures.

Les expériences de Marchoux et Salimbeni ont montré que la transmission de la spirillose des poules s'effectue, dans les conditions ordinaires, grâce à l'intervention d'un hôte intermédiaire, l'*argas*. En piquant les poules infectées, l'*argas* absorbe le virus et le conserve pendant très longtemps; il le transmet

1. MARCHOUX ET SALIMBENI, ces *Annales*, vol. XVII, sept. 1903, p. 569.

2. SAKHAROFF, ces *Annales*, vol. V, p. 564.

3. GABRITSCHESKY, *Abt für Bakt.*, vol. XXIII, nos 9-18; vol. XXVI, nos 10, 16 et 17; vol. XXVII, n° 2.

4. CANTACUZÈNE, ces *Annales*, 1899.

facilement à une poule neuve, laquelle montre les premiers signes de l'infection après une période d'incubation variable<sup>1</sup>. Mais on peut infecter la poule en lui injectant sous la peau une trace de sang contenant des spirilles. Dans ce cas, la maladie commence d'habitude 2 jours après l'inoculation et dure de 4 à 6 jours, moment où apparaît généralement la lyse. Les spirilles disparaissent alors de la circulation générale et l'animal guérit définitivement. Il n'est pas rare pourtant d'observer que certaines poules succombent quelque temps après l'achèvement de cette lyse, en présentant des signes de paralysie, ou bien avant la crise, en pleine période d'infection.

La poule n'est pas le seul organisme susceptible de prendre la spirillose. Les recherches de Marchoux et Salimbeni, ainsi que nos propres constatations, ont montré que l'oie, les jeunes poussins, le pigeon, le domino, le capucin, l'alouette et le calfat (*Padda oryzivora*) peuvent être aisément infectés par l'injection sous-cutanée de quelques gouttes de sang contenant des spirilles. Néanmoins, ces oiseaux ne se comportent pas d'une façon uniforme à l'égard de la septicémie spirillique. Ainsi, les jeunes poussins ne font jamais la crise et meurent farcis de spirilles, 2 à 8 jours après l'inoculation; il en est de même des capucins. Par contre, la crise semble être constante chez le domino, l'alouette et le pigeon. Ajoutons enfin que la pintade se montre réfractaire, ce qui est en désaccord avec les observations de Marchoux et Salimbeni.

Nos recherches se rapportent en particulier à l'étude de l'incubation et de la période d'infection, du mécanisme intime de la lyse, et des propriétés du sérum provenant des poules guéries de spirillose. D'autre part, nous avons entrepris un certain nombre d'expériences en vue d'apporter une contribution à la question si discutée, de l'état de la cytase bactériolytique dans le plasma circulant. Les résultats que ces recherches nous ont permis d'obtenir font le sujet du présent travail.

## I

### INCUBATION ET PÉRIODE D'INFECTION

Lorsqu'on introduit, dans le tissu sous-cutané d'une poule, une certaine quantité de sang renfermant du virus, on ne constate

1. Cette incubation a été de 5 et 6 jours dans nos expériences.



des spirilles isolés dans la circulation générale, qu'au bout de 2 jours <sup>1</sup>. La méthode de coloration à la vésuvine et au bleu polychrome de Unna, que nous avons décrite récemment<sup>2</sup>, permet alors de déceler quelques spirochètes libres parmi les éléments figurés du sang, qui ne montrent encore aucun changement quantitatif ou qualitatif. Il existe donc chez les poules infectées une vraie période d'incubation, que l'on ne peut raccourcir, quelle que soit la quantité de sang infectant introduite sous la peau. Comment expliquer cette période d'incubation?

Inoculons dans le tissu hypodermique ou musculaire d'une poule 0,75 c. c. de sang prélevé sur un animal en pleine période de la maladie, et examinons ce qui se passe au point d'inoculation. Nous verrons que les spirilles, très nombreux et mobiles 35 minutes après l'opération, diminuent de nombre après 2 heures et deviennent sensiblement rares vers la 9<sup>e</sup> heure. La mobilité de ces spirilles, très accentuée au début de l'expérience, est remarquablement lente au bout de 10 heures. Le lendemain, on ne constate que de rares exemplaires immobiles, qui peuvent parfois faire défaut. En nul instant on ne remarque l'englobement des vibrions par les leucocytes; par contre, la phagocytose des hématies de la poule, ou des noyaux de ces hématies, est quelquefois très prononcée.

Les spirilles disparaissent donc de l'endroit où on les a introduits; il n'y a pas de multiplication locale. Or, si l'on examine microscopiquement le sang de la poule à l'instant même où les microbes ont disparu du tissu sous-cutané, on remarque que ce sang est entièrement dépourvu d'éléments spirilliens. Il résulte donc que les spirilles, puisqu'ils disparaissent du point où on les a injectés et qu'ils sont absents de la circulation, doivent s'être réfugiés quelque part dans l'intimité de l'organisme. L'expérience qui consiste à sacrifier l'animal au bout de 26 heures après l'infection, et à injecter à des poussins du sang défibriné et des émulsions dans de l'eau salée, faites avec le tissu sous-cutané, le foie et la rate, confirme cette prévision. En effet, tandis que ce tissu s'est montré sans effet, l'organe splénique et la pulpe hépatique ont transmis à ces poussins une spirilliose mortelle.

1. Chez les petits oiseaux et les jeunes poussins, les spirilles apparaissent dans la circulation générale déjà au bout de 24 heures.

2. LEVADITI, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1903, vol. XL, p. 1505.



Néanmoins, il est à remarquer qu'un des poussins qui a reçu le sang défibriné a présenté également des signes d'infection spirillienne. Ceci prouve que ce sang, quoique stérile au point de vue de l'examen microscopique, n'en renfermait pas moins des spirilles capables d'infecter un animal aussi sensible que le poussin. La rareté excessive de ces spirilles dans la circulation générale explique les résultats négatifs de cet examen microscopique.

Les spirilles disparaissent donc plus ou moins vite du point de l'injection, pour se multiplier dans les organes et la circulation générale. Là, ils se divisent par segmentation transversale et prolifèrent d'une façon démesurée. Cette prolifération s'accompagne bientôt de modifications dans l'aspect histologique du sang, telles que la leucocytose mono et surtout polynucléaire, et la basophilie plus ou moins prononcée des hématies. Parmi ces modifications, la plus remarquable est certainement l'apparition dans le sang, de gros leucocytes mononucléaires non granulés, très probablement d'origine splénique, ainsi que la vacuolisation extrême de ces cellules. Cette vacuolisation, dont la signification nous apparaîtra au cours de ce mémoire, a été déjà vue par Cantacuzène dans la rate des oies atteintes de spirillose; elle est caractérisée par l'apparition dans le protoplasma de ces leucocytes, de grosses vacuoles remplies d'un liquide digestif, et devient d'autant plus prononcée, que l'on se rapproche de la période critique<sup>1</sup>.

Un autre fait qui caractérise les derniers jours de l'infection spirillienne, est l'agglutination des spirilles. Cette agglutination, déjà observée par Marchoux et Salimbeni, peut être facilement mise en évidence, si on place une goutte de sang entre lame et lamelle, ou si l'on prépare une goutte suspendue. Sa présence semble plaider, au premier abord, en faveur de la formation d'agglutinines spécifiques au cours de la maladie causée par le spirille brésilien. Il se peut en effet, que dans cette maladie, comme dans la fièvre typhoïde, ils opèrent une résorption de corps microbiens, résorption qui aboutit à l'élaboration des principes agglutinatifs. L'étude attentive de ce phénomène montre pourtant que cette interprétation ne saurait être justifiée. Il suffit de suivre un certain temps sous le microscope, à la température de la chambre ou à 38°, les amas de spirilles, pour

1. Rarement on constate dans le sang, des macrophages ayant englobé des hématies nucléées.



se convaincre qu'au bout de quelques minutes, ces spirilles se détachent de leurs congénères, redeviennent libres et se répandent d'une façon uniforme sur toute la préparation. Le temps employé par les vibrions pour reconquérir leur liberté, a varié dans nos expériences, de 4 à 35 minutes; il s'est montré d'autant plus bref, que l'on pratiquait l'examen vers le début de l'infection et que la température se rapprochait de 38°. Ajoutons enfin, que même les amas de spirilles fournis par la poule à une période très rapprochée de la crise finissaient par se défaire au bout de quelques instants.

Il résulte donc qu'il ne peut y avoir là un vrai phénomène agglutinatif. En effet, les agglutinines spécifiques agissent d'une façon d'autant plus intense que le temps de contact est plus durable, et d'autre part, leur action agglomérante croît avec l'élévation de la température. Les spirilles eux-mêmes, lorsqu'ils sont soumis à l'influence d'un sérum provenant d'une poule guérie, sérum qui contient de vraies agglutinines, forment des amas compacts, qui persistent longtemps et qui apparaissent d'une façon plus prompte à 38°. Il est très probable que cette fausse agglutination des spirilles est due au changement brusque que subit, au moment de la prise du sang, le milieu où vivent ces spirilles, et qu'elle ne correspond pas à une agglomération des vibrions dans l'organisme vivant. Ce qui nous le fait penser, c'est que les coupes d'une crête de poule infectée, excisée à un moment où le sang examiné *in vitro*, montrait des spirilles disposés en gros amas, ne renfermaient que des spirochètes isolés. Ce phénomène ne saurait donc nullement être interprété dans le sens d'une formation d'agglutinines au cours de la septicémie spirillique. Ces agglutinines n'apparaissent dans le sérum qu'après la crise, en même temps que d'autres principes actifs, les *immobilisines*.

## II

### LA CRISE.

La pullulation des spirilles dans le sang des poules infectées augmente jusque vers la fin du 5<sup>e</sup> ou du 6<sup>e</sup> jour. On assiste alors, dans l'espace de quelques heures, à la disparition complète de ces spirilles du torrent circulatoire



disparition qui coïncide avec une chute de la température, augmentée pendant l'infection (Marchoux et Salimbeni). En peu de temps, tous les vibrions abandonnent les capillaires périphériques, et si l'on sacrifie à ce moment l'animal, on remarque que les organes sont exempts de spirilles libres.

Quel peut être le mécanisme de cette crise ? Ce mécanisme a fait le sujet de nombreuses recherches, parmi lesquelles on peut citer celles de Metchnikoff<sup>1</sup>, Bardach<sup>2</sup>, Rudkewitsch<sup>3</sup>, Löwenthal<sup>4</sup>, Gabritschewsky<sup>5</sup>, Cantacuzène<sup>6</sup>, etc. Ces recherches ont abouti à des conclusions qui sont loin d'établir un parfait accord entre les savants qui se sont occupés de cette question. Ainsi, tandis que Metchnikoff et Cantacuzène, s'appuyant sur des observations faites à l'aide du spirille d'Obermeyer et du spirille qui provoque la maladie de Sakharoff, admettent que les phagocytes sont les vrais agents de la crise, pour Gabritschewsky, cette crise est due surtout à l'intervention des propriétés bactéricides des humeurs. Les arguments sur lesquels se basent Metchnikoff et Cantacuzène pour admettre le mécanisme phagocytaire de la crise, sont, entre autres, la persistance de spirilles très mobiles, dans le sang, jusqu'aux derniers moments de la maladie, l'absence de toute transformation granulaire des spirochètes, et la constatation directe de l'englobement des vibrions par les leucocytes (polynucléaires, dans la fièvre récurrente, et macrophages de la rate, dans la spirillose de Sakharoff). De plus, il résulte des expériences de Soudakewitch sur le singe, que l'extirpation de l'organe splénique, qui assure la destruction phagocytaire d'un grand nombre de spirilles circulants, entrave l'apparition de la crise et donne à la maladie un caractère chronique.

Par contre, suivant Gabritschewsky, le rôle prépondérant dans la destruction des spirilles pendant la crise, doit être accordé à l'intervention des bactériolysines du sérum. Cet auteur constate, en premier lieu, que le sérum des individus et des animaux guéris, acquiert bientôt après la crise, la faculté

1. METCHNIKOFF, *Virchow Arch.*, v. 169, p. 176.

2. BARDACH, ces *Annales*, 1899.

3. RUDKEWITSCH, *Arch. russes de Patholog.*, 1897-1898.

4. LOEWENTHAL, *Deutsch. med. Woch.*, 1897, n° 33.

5. GABRITSCHESKY, déjà cité.

6. CANTACUZÈNE, déjà cité.

7. SOUDAKEWITCH, ces *Annales*, vol. V, p. 545.



d'immobiliser *in vitro* l'agent pathogène de la fièvre récurrente et de la spirilllose des oies. Il voit, d'autre part, que les spirilles ont une vitalité variable suivant l'âge de la maladie, en ce sens que les vibrions retirés à une époque rapprochée de la période critique, perdent plus rapidement leurs mouvements que ceux que l'on prélève vers le début de l'infection. Enfin, Gabritschewsky affirme avoir observé la transformation granulaire des spirilles précédée par l'apparition d'un état moniliforme, s'opérer soit *in anima vili*, soit dans le tube à essai.

Le mécanisme de la crise est donc, à l'heure actuelle, un sujet de discussion, et de nouvelles recherches sont nécessaires pour apporter une solution définitive de ce problème. Voyons si les observations fournies par l'étude de la spirilllose des poules permettent de préciser d'une façon satisfaisante la nature intime du processus critique.

Si l'on admet la destruction surtout humorale des spirilles au cours de la lyse, et si l'on tient compte des données nouvellement recueillies dans le domaine de l'immunité, on peut concevoir comme il suit la disparition rapide de ces spirilles du torrent circulatoire et des organes. Au cours de l'infection, un certain nombre de vibrions ou leurs produits, sont résorbés quelque part dans l'organisme, et provoquent, à la façon des principes immunogènes (*antigènes* de Deutsch), une formation plus ou moins prononcée de sensibilisatrice bactériolytique. La quantité de cette sensibilisatrice augmente au fur et à mesure que la maladie progresse, pour atteindre au moment même de la crise, un summum. A ce moment il s'est formé, chez l'animal infecté, assez de sensibilisatrice spirillolytique pour que la destruction intégrale des spirilles soit possible, naturellement à la condition que cette sensibilisatrice ait à sa disposition une quantité suffisante de cytase. Il s'ensuit alors forcément la bactériolyse *in vivo*, phénomène, qui dans l'hypothèse, est la cause principale de la crise.

Rappelons que cette manière de voir a été soutenue par Sachs<sup>1</sup>, au sujet de la résorption des hématies d'espèce étrangère, introduites dans la circulation générale du lapin. Cet auteur constate que les érythrocytes de bœuf, injectés dans les veines du lapin, persistent assez longtemps dans le

1. H. SACHS, *Arch. f. Anat. u. Physiolog.*, 1903, p. 494.



sang périphérique, pour disparaître brusquement, à un moment donné, de cette circulation. Il voit, d'autre part, que cette disparition des hématies de bœuf coïncide avec l'apparition de l'ambocepteur hémolytique dans le sérum et avec l'appauvrissement de ce sérum en cytase.

Quelle que soit la simplicité de cette hypothèse, elle ne saura être acceptée tant que l'on ne réussira pas à démontrer, d'une façon rigoureuse, la transformation granulaire et la dissolution extracellulaire des spirilles pendant la crise. Déjà, pour ce qui concerne la question des érythrocytes, nous avons montré avant Sachs<sup>1</sup> que les hématies de pigeon introduites dans les veines du cobaye se détruisent à l'intérieur des macrophages de la rate, et ne subissent nullement l'hémolyse en dehors des cellules. Pour la spirillose des poules également, nos constatations sont loin de venir à l'appui de la théorie suivant laquelle la destruction critique des spirilles serait surtout humorale.

Examinons ce qui se passe chez une poule depuis les quelques heures qui précèdent la crise, jusqu'à la complète disparition des spirilles de la circulation générale et des organes. Nous verrons que, d'une façon constante, les microorganismes conservent jusqu'à la fin de l'expérience leur entière mobilité, et que, de plus, ils continuent à se diviser, comme d'habitude. D'autre part, les préparations faites avec le sang critique montrent, quel que soit le procédé de coloration, l'absence de tout signe de transformation granulaire ou moniliforme des spirilles. On peut affirmer, sans crainte d'être contredit, que les derniers vibrions qui persistent dans les capillaires périphériques, à la fin de la crise, conservent intactes leur mobilité et leurs propriétés morphologiques et tinctoriales.

De plus, si on a soin de sacrifier les animaux à l'instant même où les spirilles ont disparu de la circulation, et si l'on pratique l'examen des organes (foie, rate, moelle osseuse, poumon) sur des frottis, sur des coupes, ou en goutte suspendue (coloration vitale au rouge neutre ou bleu crésyl), on remarque que ces organes sont exempts de spirilles libres, et qu'ils ne renferment aucune production qui pourrait résulter de la transformation moniliforme ou granulaire de ces spirilles.

Ces constatations sont assez probantes, pour mettre

1. LEVADITI, *Congr. intern. de Bruxelles*, sect. Bactér., 1903.



déjà en doute l'existence réelle de la destruction extra-cellulaire des spirilles, par un mécanisme analogue à celui qui préside à la dissolution des vibrions cholériques (phénomène de Pfeiffer). Mais d'autres faits, concernant les propriétés bactéricides du sérum des poules atteintes de spirillose, ou guéries de la maladie, s'opposent également à la conception humorale de la crise.

Le sérum des poules qui ont survécu à la septicémie spirillaire, prélevé quelques jours après la lyse, possède des qualités immobilisantes et agglutinatives très accentuées.

EXPÉRIENCE A. — Une poule ayant fait sa crise le 5<sup>e</sup> jour, est saignée 4 jours après la disparition des spirilles. On emploie comme témoin, le sérum de poule neuve et l'eau physiologique, et on apprécie le pouvoir immobilisant et agglutinant de ces liquides, vis-à-vis des spirilles contenus dans 1 goutte de sang de poule malade. L'expérience est faite à la température de la chambre. Elle montre que si 2 gouttes de sérum de la poule guérie immobilisent instantanément les spirilles et les agglutinent en gros amas, la même quantité de sérum de poule neuve n'arrête les mouvements de ces spirilles qu'au bout de plusieurs heures. On observe également que la vitalité des vibrions est plus durable dans ce dernier sérum, que dans l'eau physiologique.

La constitution du sérum immobilisant est complexe; elle reproduit la composition mixte de certains sérums antimicrobiens et anticellulaires, en ce sens que le sérum de poule guérie est formé par une cytase thermolabile et par une sensibilisatrice thermostabile. Les recherches de Sawtchenko<sup>1</sup> ont prouvé la réalité de cette constitution complexe du sérum antispirillaire, chez les cobayes activement immunisés. Les expériences que nous avons entreprises à ce sujet, en ayant recours à l'épreuve de Bordet, ne font que confirmer cette manière de voir. En effet, si l'on fixe sur les spirilles une certaine quantité de sensibilisatrice provenant d'un sérum inactif de poule guérie, on observe que ces spirilles, plongés dans du sérum de poule neuve, débarrassent ce dernier sérum d'une partie de la cytase hémolytique qu'il contient. Voici une expérience qui a trait à ce sujet :

EXPÉRIENCE B. — Une poule est saignée le 5<sup>e</sup> jour de la maladie. On recueille les spirilles du sérum et du sang défibriné, au moyen de la force centrifuge, et on les répartit en deux portions égales *a* et *b*. La portion *a* est mise en contact à 38°, pendant 1 h. 1/2, avec 4 c. c. de sérum de poule neuve, préalablement inactivé à 56°. La portion *b* est mise pendant le même temps en présence de 4 c. c. d'un sérum inactif de poule guérie, saignée

1. SAWTCHENKO, *Arch. russes de Pathol.* 1900, p. 573.



6 jours après la crise. On recueille de nouveau, par centrifugation, les spirilles, et on les introduit dans 80 gouttes de sérum frais de poule neuve. Les liquides sont maintenus pendant 4 heures à 38° et jusqu'au lendemain à la température de la chambre; on débarrasse ces liquides des spirilles au moyen de la force centrifuge, et on apprécie leur richesse en cytase hémolytique, en se servant d'une sensibilisatrice fournie par des lapins auxquels on a injecté des hématies de bœuf.

Cytase.	Sens. hém.	Eau phys.	Sérum témoin.	Sérum a.	Sérum b.
0,05	0,3	1,65	bcp.	o	o
0,4	»	4,6	compl.	bcp.	o
0,5	»	1,2	compl.	compl.	p.compl.
0,75	»	0,95	compl.	compl.	compl.

Le sérum antispirillique est donc constitué par une cytase thermolabile et une sensibilisatrice thermostabile. Néanmoins, il est facile de constater qu'un tel sérum, quoique préalablement chauffé pendant une 1/2 heure à 56°, continue à immobiliser, comme le sérum frais, les spirilles renfermés dans une goutte de sang infectant. Cette observation, en apparence en contradiction avec la thermolabilité de la cytase, s'explique facilement, si l'on pense que le sérum chauffé, mis en présence du sang riche en spirilles, est réactivé par l'alexine que les leucocytes de ce sang mettent en liberté, sitôt le mélange fait.

La constitution complexe du sérum des poules guéries nous permet de préciser davantage certains termes de l'hypothèse de la destruction extracellulaire des spirilles. On sait que la cytase existe dans le sérum des animaux neufs, et que la richesse de ce sérum en complément est sensiblement constante (von Dungern, Simnitzky <sup>1</sup>). Il est établi d'autre part (J. Bordet), que l'immunisation ne modifie guère la teneur du sérum en alexine bactériolytique et hémolytique, et qu'elle se borne à déterminer l'apparition des anticorps spécifiques, en particulier de la sensibilisatrice et de l'agglutinine. On peut donc admettre, si l'on veut se placer au point de vue de l'hypothèse précitée, qu'au cours de l'auto-immunisation qui s'opère pendant l'infection

1. SIMNITZKY, *Munch. med. Woch.* 1903, n° 50, p. 2475.



spirillienne, il se forme une certaine quantité de sensibilisatrice, et que la richesse des humeurs en cette sensibilisatrice, s'accroît au fur et à mesure que l'on se rapproche de la crise. Celle-ci apparaît à l'instant même où ces humeurs renferment suffisamment d'ambocepteurs pour que les spirochètes puissent se dissoudre sous l'influence de la cytase bactériolytique, laquelle ne varie guère pendant l'évolution de la maladie.

Si les phénomènes se passaient réellement ainsi, on devrait constater que les spirilles, puisés aux divers moments de l'infection, sont doués *in vitro*, d'une vitalité inégale, en ce sens que les individus cueillis au voisinage de la crise succombent plus rapidement que les microbes retirés de l'organisme au début de la maladie. De plus, on devrait observer que cette vitalité des spirilles est de beaucoup plus courte, lorsqu'on a soin de placer ces microorganismes dans un excès de sérum frais renfermant de la cytase. En effet, si l'on admet que, vers la fin de l'infection, les spirilles sont insuffisamment sensibilisés, pour pouvoir s'immobiliser et se dissoudre dans le plasma supposé riche en alexine, un excès de cette alexine, ajouté *in vitro* à ces spirilles, ne pourra qu'abréger la durée de leur mobilité. On sait, par exemple, depuis les recherches de Morgenroth, que la présence d'une grande quantité de cytase hémolytique provoque la dissolution complète des hématies insuffisamment sensibilisées. Que répond l'expérience à ce propos ?

EXPÉRIENCE C. — Une poule, atteinte de spirillose, est saignée le 3<sup>e</sup>, le 4<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour de la maladie. Elle fait la crise à la fin du 5<sup>e</sup> jour. Deux gouttes de sang, provenant de ces 3 saignées, sont diluées dans 40 gouttes de sérum frais de poule neuve, et dans une quantité égale du même sérum,

HEURES	TEMPÉRATURE DE LA CHAMBRE						38°					
	Sérum actif.			Sérum inactif.			Sérum actif.			Sérum inactif.		
	3 <sup>e</sup> j.	4 <sup>e</sup> j.	5 <sup>e</sup> j.	3 <sup>e</sup> j.	4 <sup>e</sup> j.	5 <sup>e</sup> j.	3 <sup>e</sup> j.	4 <sup>e</sup> j.	5 <sup>e</sup> j.	3 <sup>e</sup> j.	4 <sup>e</sup> j.	5 <sup>e</sup> j.
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24 h.	lent.	lent.	act.	lent.	lent.	act.	lent.	act.	nul.	lent.	act.	nul.
48 h.	lent.	act.	lent.	lent.	lent.	lent.	part.	nul.	nul.	part.	nul.	nul.
70 h.	part.	lent.	lent.	part.	lent.	lent.	part.	nul.	nul.	nul.	nul.	nul.
96 h.	—	lent.	—	lent.	—	—	—	—	—	—	—	—



préalablement inactivé à 55°. On apprécie la vitalité des spirilles, maintenus à la température de la chambre et à 38°.

Il résulte de cette expérience que les spirilles sont d'autant moins viables, en dehors de l'organisme, que l'on se rapproche de la fin de la maladie, comme l'avait déjà affirmé Gabritschewsky. Elle montre de plus, que la température du thermostat exerce une influence défavorable sur la vitalité de ces spirilles. Mais, chose remarquable, on constate que cette vitalité est la même, que les spirilles soient mis en présence d'un sérum actif ou d'un sérum préalablement chauffé à 56°. *L'excès de cytase n'influe donc nullement la longévité des vibrions retirés de l'animal infecté.*

Cette dernière observation permet de mettre en doute l'hypothèse de la destruction extracellulaire des spirilles pendant la période critique. En effet, si les mouvements des microbes puisés au voisinage de la crise cessaient rapidement par suite de l'intervention de la sensibilisatrice, on devrait constater une différence entre les microorganismes soumis à l'influence d'un excès de cytase, et ceux qui ne le sont pas. Il faut donc admettre que d'autres causes entrent en jeu pour déterminer cette variabilité dans la longévité des spirochètes, et parmi ces causes, on devrait peut-être invoquer l'âge de ces microorganismes, et la quantité plus ou moins grande d'individus qui se trouvent dans un même volume de liquide.

On peut pourtant objecter que, dans l'organisme vivant, les spirilles sont réellement chargés de sensibilisatrice au voisinage de la crise, mais qu'ils ne se dissolvent pas encore, pour le motif qu'ils n'ont pas à leur disposition une quantité suffisante de cytase. Néanmoins, l'expérience la plus simple qui consiste à introduire dans la circulation générale d'une poule infectée, une grande quantité de sérum de poule neuve, riche en cytase, et d'examiner l'état des spirilles après l'injection, montre que cette objection n'est pas fondée. En effet, même lorsqu'on administre par voie intra-veineuse, à une poule arrivée au 5<sup>e</sup> jour de la maladie, de 5 à 6 c. c. de ce sérum, on ne remarque aucune immobilisation des spirilles circulants, et nul signe de transformation granulaire.

Tout porte donc à penser que la sensibilisation des spirilles au cours de la septicémie brésilienne et pendant la crise, n'est

rien moins que démontrée. Malgré nos efforts pour la mettre en évidence d'une façon indiscutable, les résultats que nous avons obtenu ont été des plus défavorables. Nous avons pensé, par exemple, que l'appréciation de la teneur du sérum des poules malades en cytase hémolytique, pourrait fournir des faits en faveur de l'hypothèse de la sensibilisation. Mais, là aussi, les constatations faites ont été en désaccord avec les desiderata de cette hypothèse.

Si les spirilles se détruisaient dans l'organisme en se dissolvant, comme se dissout le vibrion cholérique soumis à l'influence d'un immun-sérum spécifique, on devrait observer immédiatement avant la crise, ou pendant cette crise, une diminution marquée du pouvoir réactivant du sérum vis-à-vis de l'ambocepteur hémolytique. On sait, depuis les recherches de Bordet et Gengou<sup>1</sup>, que lorsque ce vibrion cholérique fixe la sensibilisatrice bactériolytique et se transforme en granules, il absorbe non seulement l'alexine microbicide, mais aussi la cytase hémolysante. En se dissolvant dans la circulation générale ou dans les organes des poules infectées, les spirilles devraient forcément appauvrir le sérum de ces poules, non seulement en complètement spirillolytique, mais aussi en cytase hémolytique.

Or, les expériences que nous avons entreprises dans cette direction, nous ont montré que si le sérum des poules malades perd une partie de sa cytase hémolysante, cette perte est très minime et peut faire même défaut<sup>2</sup>. Elle peut s'expliquer facilement, si l'on se rappelle que tout changement dans l'état physiologique d'un organisme, amène des variations marquées dans la teneur du sérum en alexine hémolytique, que ce changement soit une intoxication (phosphore, Ehrlich et Morgenroth), ou une infection (abcès, Métalnikoff).

Il est donc évident que la disparition des spirilles pendant la crise, ne saurait reconnaître l'intervention d'une sensibilisatrice spécifique, considérée comme agent bactériolytique. Pour cela, il faudrait que le sérum des poules guéries de la maladie possédât des propriétés spirillolytiques manifestes; il faudrait surtout que ce sérum, retiré au moment même de la

1. BORDET ET GENGOU, ces *Annales*, 1902.

2. Ces expériences ont été faites avec une sensibilisatrice fournie par les lapins injectés avec du sang de bœuf. Les variations de la cytase ont oscillé entre 0,05 et 0,1.



crise, montrât des qualités immobilisantes accentuées. Il faudrait en un mot, que ce sérum eût toutes les particularités du sérum fourni par les animaux vaccinés contre le vibrion cholérique, lequel immobilise, agglutine et transforme en granules ce vibrion. Or, l'expérience montre que ni le sérum des poules guéries, ni celui que l'on prélève au cours de l'infection spirillienne, n'exercent, dans le tube à essai, aucune influence lytique sur les spirochètes. Elle prouve également que les immobilisines ne font leur apparition, dans les humeurs, qu'à une période assez reculée de la crise (24 heures et plus, dans nos recherches) <sup>1</sup>.

Si la dissolution extra-cellulaire des spirilles est un fait plutôt supposé que réel, et si un troisième mécanisme capable d'expliquer la disparition critique de ces spirilles, n'intervient pas <sup>2</sup> il faut bien supposer que cette disparition est due à l'action phagocytaire des cellules. Cette action phagocytaire, le microscope nous la montre aisément dans les organes hématopoiétiques, particulièrement dans la rate et la moelle osseuse; elle a été déjà maintes fois constatée (Metchnikoff, Cantacuzène, Ivanoff, Tiktin <sup>3</sup>) et n'est pas niée même par Gabritchewsky, le défenseur le plus ardent de la destruction humorale des spirochettes.

Il y a peu à dire sur cette intervention des phagocytes dans la réalisation de la crise, qui ne soit déjà décrit et figuré par les auteurs qui ont étudié de près cette question. Les figures ci-jointes (planche I), montrent que dans la septicémie de Marchoux et Salimbeni, comme dans la spirillose de Sakharoff, ce sont les macrophages de la rate et de la moelle osseuse qui englobent et digèrent dans leurs vacuoles des spirilles ayant conservé l'intégrité de leurs caractères morphologiques. Les coupes de rate de jeunes poussins, d'alouettes et de dominos, quoique assez difficilement colorables, montrent d'une

1. L'immobilisation des spirilles n'est pas toujours un indice de la mort de ces microorganismes. Souvent, les spirochètes dépourvus de mouvements peuvent se remettre en marche et posséder une virulence assez prononcée.

2. On peut penser, par exemple, que les spirilles se transforment au moment de la crise, dans les formes particulières, représentant un stade quelconque, dans le cycle évolutif de ces parasites. Cette hypothèse, qui a pour elle les constatations récentes de Schaudinn, n'a pas pu être vérifiée par les quelques recherches que nous avons entreprises dans cette voie.

3. TIKTIN, *Cbt. f. allg. Path-und-Pathol. an*, vol. VIII.

façon indubitable ce phénomène de la phagocytose, que l'on peut déceler d'ailleurs sur les frottis teints à la thionine phéniquée. Mais dans ce dernier cas, les cellules étant plus ou moins détruites par la compression, on ne peut établir qu'avec une certaine difficulté les rapports qui existent entre les spirilles et les macrophages de la rate. Néanmoins, ce qui apparaît d'une façon frappante sur ces frottis, ce sont des vacuoles parfois considérables, remplies de spirilles entortillés ou ondulés, mais nullement granuleux. Ces vacuoles font partie de quelque macrophage écrasé ; il n'est pas rare en effet, de constater qu'elles sont incluses dans les débris protoplasmiques qui entourent le noyau modifié de ces macrophages. Ce qui fait penser de plus, que ces vacuoles appartiennent réellement à des mononucléaires partiellement détruits, c'est que les gros lymphocytes du sang, considérés au moment même où l'on examine la rate, renferment un certain nombre de cavités vacuolaires remplies de liquide, fait qui a été déjà remarqué par Cantacuzène.

Un point seulement doit attirer notre attention dans cet ordre de faits. Si l'on sacrifie les animaux à des intervalles plus ou moins rapprochés de la crise, ou en pleine période critique, et si l'on apprécie l'intensité des phénomènes phagocytaires qui s'opèrent dans les organes hématopoïétiques, on voit que la phagocytose, accentuée pendant l'infection, peut être très faible immédiatement avant cette crise. C'est là une observation qui semble venir à l'encontre de la destruction intra-phagocytaire des spirilles, comme cause déterminante de la crise. Néanmoins, un examen attentif montre que chez les poules sacrifiées pendant l'évolution de la crise, il est possible de déceler par le procédé de la coloration vitale au rouge neutre, des macrophages spléniques renfermant, dans leurs vacuoles, des spirilles dont la digestion est déjà avancée. Il est probable que le pouvoir assimilatif des globules blancs s'accroît au cours de l'infection spirillienne, ce qui fait qu'au moment même de la crise, les spirilles sont anéantis aussitôt qu'ils sont englobés par ces globules blancs. Il est possible également que la sensibilisatrice joue un certain rôle dans la réalisation de ce phénomène de destruction rapide des spirilles à l'intérieur des macrophages. La présence dans les humeurs de l'organisme infecté, d'une quantité d'anticoagulant insuffisante pour provoquer la dissolution extra-cellu-



laire des vibrions, peut faciliter l'englobement et la digestion intra-protoplasmique de ces vibrions. On sait, en effet, depuis les constatations de Sawtschenko, que, chez le cobaye, l'ambocepteur spécifique incite les phagocytes à englober les spirilles, et, très probablement, rend plus efficace l'action digestive des diastases leucocytaires.

Quoi qu'il en soit, l'existence de la phagocytose des spirilles au cours de la septicémie brésilienne, contraste trop avec l'absence de preuves en faveur de la destruction extra-cellulaire de ces spirilles, pour qu'on ne soit autorisé à lui attribuer un rôle déterminant dans le mécanisme de la crise. Les observations que nous avons faites sur la septicémie de Marchoux et Salimbeni, sont ainsi d'accord avec les constatations de Metchnikoff et de Cantacuzène concernant la fièvre récurrente et la spirillose des oies, pour accorder aux leucocytes une influence de premier ordre dans la guérison spontanée des animaux.

### III

#### QUELQUES PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES POULES GUÉRIES DE LA SPIRILLOSE

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que le sérum des poules guéries depuis un certain temps de la spirillose acquiert la propriété d'immobiliser avec une extrême rapidité, les spirilles *in vitro*. Il était intéressant d'étudier l'action exercée par ce sérum sur les poules infectées, et voir, par exemple, s'il n'est pas capable de déterminer l'apparition précoce de la crise. Dans ce cas, on aurait le moyen de préciser le mécanisme de cette crise provoquée, et d'établir un rapprochement entre ce mécanisme et celui qui préside à la production de la crise spontanée.

Si l'on injecte dans les veines d'une poule arrivée au 3<sup>e</sup> ou au 5<sup>e</sup> jour de la maladie, de 2 à 4 c. c. de sérum de poule guérie<sup>1</sup>, préalablement inactivé à 56°, on constate que cette injection est rapidement suivie de troubles très graves, qui souvent se terminent par la mort de l'animal. La poule est prise d'une forte dyspnée, tombe sur le côté, devient somnolente, présente des convulsions et succombe au bout de quelques minutes. Le sérum

1. L'expérience réussit mieux si l'on se sert de sérums de poules guéries depuis plusieurs jours.

de poule guérie est donc toxique pour l'animal atteint de spirillose; il n'exerce aucune action nocive sur les poules neuves, qui peuvent recevoir, sans danger, 5 et 6 c. c. de ce sérum.

Quelle peut être la nature de cette action toxique du sérum de poule guérie? L'examen du sang, pratiqué à divers intervalles, montre que, malgré les propriétés immobilisantes accentuées de ce sérum<sup>1</sup>, les spirilles continuent à se mouvoir jusqu'à la mort de l'animal; il permet de voir également que ces spirilles s'agglutinent d'une façon intense, et que les amas formés, à l'encontre de ceux que l'on observe au cours de l'infection, persistent indéfiniment<sup>2</sup>.

Mais l'action du sérum ne se borne pas là. Les préparations colorées montrent, en effet, que les leucocytes mono et polynucléaires de la circulation générale, se disposent en agglomérats autour des spirilles agglutinés et subissent une transformation vacuolaire des plus accentuées. En outre, dans un assez grand nombre de cas, ces leucocytes, influencés par le sérum injecté, saisissent des spirilles entiers et des hématies nucléées, ayant conservé leur hémoglobine (fig. 15).

Le sérum de poule guérie exerce donc une action double sur les éléments qui circulent dans le système vasculaire des animaux malades. Il provoque à la fois l'agglutination des spirilles et l'agglomération des globules blancs, suivie de la vacuolisation plus ou moins intense de ces globules. La mort de l'animal s'explique ainsi facilement, si l'on pense que ces amas de spirilles et de leucocytes déterminent des embolies capillaires dans le poumon et le système nerveux, embolies qui peuvent amener des troubles graves de la respiration et de l'innervation. La question est de savoir si le sérum tue en agissant sur les spirochètes, ou sur les globules blancs de l'animal en expérience. Nos recherches montrent que la première interprétation est la plus vraisemblable. En effet, nous avons constaté que, d'une part, le sérum de poule guérie se montre inoffensif pour des animaux qui, exempts de spirilles, ne présentent pas moins une forte leucocytose (spirillose avortée); nous avons vu, d'autre part, qu'il suffit de fixer dans le tube à essai,

1. Les sérums employés immobilisaient instantanément à les spirilles la dose de 1/10<sup>e</sup> de goutte pour 1 goutte de sang.

2. Surtout les amas des premières prises de sang (immédiatement et 5 minutes après l'injection).



sur les spirilles, l'agglutinine et l'immobilisine contenues dans ce sérum, pour lui enlever la plus grande partie de son pouvoir toxique.

Le sérum des poules guéries détermine donc la mort des animaux infectés, pour le motif qu'il agglutine *in anima vili* les spirochètes circulants et qu'il provoque ainsi des embolies capillaires dans les divers organes. L'influence particulière qu'il exerce sur les leucocytes s'explique par la présence d'une isoleucoagglutinine, dont la formation est très probablement due à la résorption des globules blancs qui s'opère au cours de la septicémie spirillienne. Ajoutons enfin que ce sérum ne possède nul pouvoir isolytique pour les hématies de poule neuve ou malade.

Mais, tous les animaux infectés ne succombent pas après l'inoculation intraveineuse du sérum de poule guérie. Un certain nombre d'entre eux, surtout ceux qui ont reçu des petites doses, survivent, et alors on peut assister à l'apparition précoce de la crise, qui peut avoir lieu le 3<sup>e</sup> ou le 4<sup>e</sup> jour de la maladie. Cette crise succède de très près à l'introduction du sérum; elle survient parfois 3 ou 4 heures après l'opération et ne diffère en rien de la crise spontanée. L'examen microscopique du sang et des organes montre en effet, que cette crise précoce s'accompagne également de l'englobement plus ou moins accentué des spirilles par les macrophages; il permet de voir en outre, qu'aucun signe de transformation granulaire n'accompagne la disparition de ces spirilles du sang périphérique.

Il n'y a qu'une seule dissemblance entre ces deux crises : c'est que, dans la crise provoquée, on rencontre plus souvent, dans le sang circulant, des macrophages ayant phagocyté des spirilles entiers ou entortillés, constatation qui est assez rare au cours de la crise spontanée (fig. 7-11).

Il résulte donc que le sérum de poule guérie, introduit dans les veines d'un animal malade, est capable de provoquer parfois l'apparition précoce de la crise, laquelle reconnaît comme la crise spontanée, l'intervention des phagocytes. Il est à penser que dans ce cas, la sensibilisatrice renfermée dans ce sérum, agit, comme l'ont prouvé les recherches de Sawtschenko, à la fois sur les spirilles et sur les leucocytes, pour déterminer la phagocytose rapide de ces spirilles. On s'explique ainsi facile-

ment cette formation de vacuoles digestives dans les globules blancs influencés par ce sérum, en considérant ce phénomène comme une exagération des fonctions digestives de ces leucocytes. Il s'agit, en somme ici, d'un mécanisme analogue à celui qui préside à la genèse de l'anémie et de l'hémoglobinurie chez les animaux qui reçoivent dans la cavité péritonéale, une certaine quantité de sérum hémolytique inactif. Nos expériences ont montré, à ce propos, que la sensibilisatrice contenue dans ce sérum, en agissant sur les hématies de la circulation et sur les macrophages de la rate, détermine une forte érythrophagocytose dans cet organe, et aboutit à l'anémie et à l'hémoglobinurie constatées <sup>1</sup>.

#### IV

##### L'ÉTAT DE LA CYTASE BACTÉRIOLYTIQUE DANS LE PLASMA

L'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux ou activement immunisés, est une question très discutée à l'heure actuelle. De nombreux auteurs ont essayé de prouver la liberté de cette cytase dans le sang circulant, en s'adressant à l'étude des plasmas artificiellement préparés (Lambotte <sup>2</sup>, Falloise <sup>3</sup>, Bellei <sup>4</sup>). Ils ont constaté que les plasmas obtenus, soit par la méthode de Freund, soit à l'aide de divers principes anticoagulants, ont un pouvoir bactériolytique et hémolysant égal, sinon supérieur, à celui du sérum du même animal. Leurs conclusions sont venues ainsi à l'encontre des observations antérieures de Gengou, suivant lesquelles le plasma de plusieurs mammifères, préparé à l'aide de tubes enduits de paraffine, serait moins microbicide que le sérum correspondant.

Néanmoins, la valeur démonstrative de ces expériences ne saurait égaler celle des recherches faites dans l'organisme vivant, recherches qui prouvent que les qualités réactivantes du sang circulant vis-à-vis d'une sensibilisatrice vibriolytique ou cytolytique, sont inférieures à celles du sérum, sinon nulles <sup>5</sup>. Comme le remarquent Löwit et Schwarz <sup>6</sup>, la présence de la

1. LEVADITI, ces *Annales*, 1902.

2. LAMBOTTE, *Abt. für Bakt.*, vol. XXXIV, n° 1, p. 453.

3. FALLOISE, *Bull. Acad. roy. de Belgique*, 1903, p. 521.

4. BELLEI, *Munch. med. Woch.*, 1904, n° 2, p. 53.

5. LEVADITI, Ces *Annales*, 1901-1902.

6. LÖWIT ET SCHWARZ, *Arch. für. Heilkunde*, 1903.



cytase dans les plasmas artificiels ne peut être invoquée en faveur de la liberté de cette cytase, qu'à la condition d'expérimenter avec des plasmas littéralement dépourvus de fibrin-ferment. Or, les expériences de contrôle entreprises par les auteurs allemands, ont montré que tous ces plasmas artificiels, même celui obtenu d'après la méthode de Delezenne, contiennent des quantités appréciables de plasmase et que, par conséquent, on n'est nullement autorisé à les identifier avec le plasma qui circule dans l'organisme vivant.

Nous avons entrepris un certain nombre de recherches pour préciser si, dans la spirillose, maladie où les microorganismes circulent longtemps dans le système vasculaire, il y a une dissimilitude entre les propriétés du sérum et du plasma, considérées au même moment de l'infection. Malheureusement, ces recherches ont été rendues difficiles par le fait que la forte leucocytose qui existe au cours de la spirillose, confère au sang une très grande coagulabilité, et empêche la préparation d'un plasma idéal d'après le procédé de Delezenne. Pourtant, dans bon nombre de cas, il nous a été possible d'obtenir du plasma de poules infectées qui se maintenait liquide pendant plusieurs heures. Dans ces cas, nous n'avons pu remarquer aucune différence entre les propriétés de ce plasma et celles du sérum correspondant, appréciées à l'égard des spirilles de la même poule; il en fut de même du plasma et du sérum des animaux guéris de la maladie.

Un fait, pourtant, a été constant dans ces recherches. C'est que ce plasma, quoique relativement incoagulable, agglutinait les spirilles d'une façon beaucoup plus intense que le sérum, à un moment où, dans la circulation générale de la poule qui fournissait ce plasma et ce sérum, ces spirilles étaient isolés et mobiles. Ce fait est très important, puisqu'il permet de conclure que le plasma préparé par nous, possédait, en dehors du fibrin-ferment, des propriétés agglutinatives qui n'existaient guère dans les humeurs de l'animal vivant. Ce plasma ne saurait par conséquent être identifié avec celui qui circule dans le système vasculaire, et l'étude de ses propriétés bactéricides et hémolytiques ne peut nullement être utilisée, pour résoudre définitivement le problème de l'état de la cytase dans le courant circulatoire.

## EXPLICATION DE LA PLANCHE I

FIG. 1 à 4. — Coupes de rate de domino. *a*, macrophages avec grosses vacuoles renfermant des spirilles (*s*).

FIG. 5. — Gros mononucléaire du sang périphérique d'une poule infectée. *g*, hématie englobée; *s*, spirilles libres.

FIG. 6. — Macrophage de la rate d'une poule, sacrifiée au 4<sup>e</sup> jour de l'infection. *v*, vacuole avec spirille.

FIG. 7, 8 et 11. — Macrophages du suc pulmonaire prélevé chez une poule infectée (injection intra-veineuse de 2 c. c. de sérum de poule guérie). *v*, vacuoles avec *s*, spirilles entortillés.

FIG. 9 et 10. — Gros mononucléaires du sang périphérique puisé chez une poule infectée, qui a reçu en injection sous-cutanée 2 c. c. de sérum de poule guérie (crise). *v*, vacuoles avec *s*, spirilles; *g*, hématie partiellement englobée.

FIG. 12. — Coupe de rate d'un poulet mort le 4<sup>e</sup> jour de la maladie. *m*, macrophages avec *s*, spirilles entortillés, et *s*, spirilles droits.

FIG. 13. — Coupe de rate d'alouette infectée: *m*, macrophages renfermant une masse hyaline (*h*) et des spirilles (*s*) dans une vacuole (*v*).

FIG. 14. — Frottis de rate de poule infectée, *m* macrophages; *s* spirilles entortillés, renfermés dans des vacuoles, *n* macrophage écrasé.

FIG. 15. — Amas de leucocytes dans le sang du cœur d'une poule ayant reçu, en injection sous-cutanée, 2 c. c. du sérum de poule guérie, *m* macrophage ayant englobé deux hématies *h*; *p* leucocyte polynucléaire renfermant un spirille, *s*, dans une vacuole, *v*.



# Le Passage du Virus Rabique à travers les Filtres

PAR M. P. REMLINGER <sup>1</sup>

---

## DEUXIÈME MÉMOIRE.

---

Depuis la publication de notre première note <sup>2</sup>, plusieurs travaux ont paru, de nature à modifier l'opinion classique que le *virus rabique ne passe pas à travers les filtres*. Le 28 juin 1903, di Vestea annonce à l'Académie médicale de Pise qu'en filtrant une émulsion de virus rabique à travers la bougie Berkefeld sous une pression de 2 à 6 atmosphères, il a réussi quatre fois sur six à mettre en évidence le passage du virus. La même expérience, répétée avec Chamberland F, lui a donné également des résultats positifs, quoique avec une fréquence moindre.

Un peu plus tard, Schüder <sup>3</sup> trouve un filtre (il n'en donne malheureusement pas la composition) qui arrête le vibrion cholérique, mais laisse passer à tout coup le virus rabique : « Avec le filtrat, dit-il, on arrive à reproduire la rage avec la même régularité que si on inoculait une émulsion du cerveau d'animaux enragés. »

Bertarelli et Volpino <sup>4</sup> réussissent eux aussi à obtenir avec la bougie Berkefeld un filtrat infectant. Moins heureux que di Vestea, ils échouent avec Chamberland F. Comparant la filtration à travers la terre d'infusoires et le papier, ils obtiennent un filtrat actif à travers un papier simple et un filtrat inactif à travers un triple papier.

Celli et de Blasi <sup>5</sup> traitèrent avec du sable fin le cerveau et la moelle d'animaux ayant succombé au virus de rue ou au virus fixe, et ils soumettent le mélange à une pression de trois cents atmosphères au moyen de l'appareil de Büchner. Le liquide qui s'écoule est étendu d'eau, infecté avec des cultures

1. Ces *Annales*, décembre 1903.

2. *Société de Biologie*, 13 juin 1903.

3. SCHÜDER, *Deutsche med. Wochenschrift*, 24 septembre 1903.

4. BERTARELLI et VOLPINO, *Riv. d'Igiene e sanità pubblica*, 16 novembre 1903.

5. CELLI et DE BLASI, *Deutsche med. Wochenschrift*, 10 décembre 1903.

virulentes, et filtré au moyen de la trompe à travers des bougies Berkefeld ordinaires. La plupart des chiens et des lapins qui reçoivent sous la dure-mère  $1/4$  à  $1/2$  c. c. du filtrat succombent. Les uns meurent de rage paralytique comme le démontrent les passages. Les autres succombent à des accidents rappelant ou non la rage, et qui paraissent devoir être ainsi attribués à l'action de la toxine rabique.

Les faits précédemment annoncés par nous se trouvant ainsi confirmés, nous désirons combler quelques lacunes de notre premier mémoire et essayer de faire faire à cette question de la filtration du virus rabique quelques pas en avant.

#### I. PASSAGE DU VIRUS A TRAVERS PLUSIEURS BOUGIES BERKEFELD V.

Le virus rabique traversant très facilement la bougie Berkefeld V, il était intéressant de rechercher ce que devenait ce passage lorsqu'on essayait de l'effectuer à travers non plus une seule, mais plusieurs bougies V.

Le 13 décembre 1903, le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus fixe est émulsionné finement dans 300 c. c. d'eau, puis on fait traverser à cette émulsion la bougie Berkefeld V. On conserve la quantité de filtrat nécessaire à l'inoculation de 10 lapins. Le reste est passé à travers une 2<sup>e</sup> bougie V. On conserve encore le liquide nécessaire à 10 trépanations. Le reliquat est filtré à travers une 3<sup>e</sup> Berkefeld V. et on trépane 10 nouveaux lapins. Les résultats obtenus ont été légèrement paradoxaux. 6 lapins du premier lot, 7 du deuxième et 9 du troisième ont pris la rage.

#### II. PASSAGE DU VIRUS A TRAVERS LES BOUGIES BERKEFELD N ET W.

L'expérience précédente paraissait démontrer que l'organisme ultra-microscopique de la rage était arrêté dans les bougies, en raison moins de ses dimensions que du colmatage des parois filtrantes par les matières albuminoïdes de l'émulsion, et elle permettait de supposer que, si on parvenait à supprimer ou tout au moins à diminuer ce colmatage, on pourrait faire traverser au virus rabique des bougies plus serrées que Berkefeld V. La dilution de l'émulsion était le moyen le plus simple d'arriver à ce but. Elle a donné des résultats négatifs. Des résul-



tats meilleurs ont été obtenus en usant au couteau une bougie Berkefeld V, en filtrant une première fois au travers l'émulsion rabique, puis en faisant traverser à ce filtrat une Berkefeld N ou W. La réussite de cette expérience n'est pas fatale. Il est bon de choisir des lapins jeunes et d'inoculer à chacun d'eux un 1 c. c.  $1/2$  de liquide. Dans les deux faits qui suivent, ces conditions ont été réalisées et le passage du virus a pu être démontré :

EXPÉRIENCE I. — Le 5 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. L'émulsion est passée à travers une Berkefeld V dont les parois ont été usées au couteau. La filtration s'opère rapidement, beaucoup plus facilement qu'avec une bougie Berkefeld ordinaire. Le liquide obtenu est légèrement louche. Deuxième filtration à travers Berkefeld N. Le liquide passe clair. Il est inoculé à la dose de 1 c. c.  $1/2$  sous la dure-mère de dix jeunes lapins. Deux animaux ont succombé le 17 et le 18 (12<sup>e</sup> et 13<sup>e</sup> jour) à une rage paralytique classique. Passages positifs.

EXPÉRIENCE II. — Le 6 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné de même dans 250 c. c. d'eau. Passage à travers une Berkefeld V usée au couteau. Le filtrat est louche. Passage à travers Berkefeld W. Le liquide est clair. Il est inoculé à la dose de 1 c. c. à 1 c. c.  $1/2$  sous la dure-mère de 10 lapins. Le 17 janvier, le plus petit des dix animaux inoculé (poids 1 kilogr) présente une légère paralysie du train postérieur. Le lendemain, la rage paralytique est classique. Mort le 19 (13<sup>e</sup> jour); le bulbe sert à faire deux passages. Ces deux animaux sont pris l'un et l'autre le 26 janvier (7<sup>e</sup> jour). Ils ont succombé l'un le 27 (8<sup>e</sup> jour), l'autre le 29 (10<sup>e</sup> jour).

La bougie Berkefeld W est une bougie extrêmement serrée. De ce qu'elle peut livrer passage au virus rabique, il s'ensuit que ce virus est notablement plus petit que nous ne l'avions cru.

### III. VIRUS RABIQUE ET BOUGIE CHAMBERLAND F.

Nous avons essayé à l'aide du même procédé de faire traverser au virus la bougie Chamberland F. Nous avons échoué.

Le 28 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. L'émulsion est filtrée à travers une bougie Berkefeld usée au couteau puis, à travers Chamberland F. Le filtrat est inoculé à la dose de 1 c. c. à 1,5 c. c. sous la dure mère de 10 lapins. Aucun de ces animaux n'a contracté la rage.

Il eût été intéressant d'essayer de faire traverser le virus à des bougies F<sup>1</sup>, F<sup>5</sup>... F<sup>10</sup> débitant 4, 5... 10 fois plus d'eau que les bougies F. Malheureusement, il nous a été impossible de nous procurer de ces modèles. Nous avons obtenu par contre les mêmes résultats négatifs avec une bougie Chamberland dont

les parois avaient été, avant la stérilisation, usées au papier de verre.

Le 1<sup>er</sup> février 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. On ajoute 4 cultures en bouillon de choléra des poules, et on filtre à travers une Chamberland F dont les parois ont été très amincies par friction au papier de verre. Inoculation de 8 lapins avec 1 c. c. à 1,5 c. c. du filtrat. Aucun de ces animaux n'a succombé à la rage, non plus du reste qu'au choléra des poules.

#### IV. MANQUE DE CORRÉLATION ENTRE LE DÉBIT D'UNE BOUGIE ET LE PASSAGE DU VIRUS RABIQUE

En présence de ces résultats négatifs, nous avons comparé le débit de bougies Chamberland qui n'avaient pas laissé passer le virus et le débit de bougies Berkefeld qui s'étaient au contraire laissé traverser par lui. Il s'est trouvé, tous calculs faits, que le débit de ces dernières était sensiblement moins considérable. Faut-il conclure de là que les bougies de porcelaine présentent au passage du virus rabique une résistance plus forte que les bougies en terre d'infusoires? Cette conclusion ne s'impose nullement, car, toutes choses égales d'ailleurs : poids du cerveau, degré de la dilution, pression, durée de la filtration, etc., il existe entre le débit d'une bougie et le passage du virus rabique un rapport beaucoup moins étroit qu'on ne le supposerait à priori. L'expérience suivante en fait foi :

Avec une amabilité dont nous avons le devoir de la remercier ici, la maison Berkefeld a bien voulu nous fabriquer des bougies ayant toutes les mêmes dimensions, 5 c. de long sur 2,5 c. de large, mais dont le débit variait entre 769 et 288 c. c. (calcul fait pour 1 minute et une pression de trois atmosphères). Ces différentes bougies ont été stérilisées, puis chacune d'elles a servi à filtrer l'émulsion d'un cerveau de lapin dans 250 c. c. d'eau. Le liquide a été injecté à la dose de 1 c. c. sous la dure-mère d'un certain nombre d'animaux. Le tableau suivant fixe les résultats obtenus.

Débit de la bougie.	Nombre de lapins inoculés.	Nombre de lapins qui ont pris la rage.	Pourcentage.
769 c. c.	7	7	100 0/0
576 —	8	8	100 0/0
528 —	8	6	75 0/0



480 c. c.	8	5	62 0/0
432 —	7	4	14 0/6
384 —	6	4	66 0/0
336 —	6	0	0
288 —	9	6	66 0/0

Il eût été intéressant de poursuivre cette expérience avec des filtres d'un débit plus faible encore. Mais les dernières bougies employées figurant déjà parmi les bougies N que, d'après nos expériences, le virus rabique ne traverse qu'exceptionnellement, nous avons jugé inutile de faire fabriquer des bougies d'un débit inférieur à 288 c. c. L'expérience précédente ne donne donc pas la limite de la perméabilité des bougies Berkefeld au virus rabique. Elle montre seulement qu'il n'existe pas de rapport étroit entre le débit et la traversée du virus, et elle fait concevoir le passage des organismes ultra-microscopiques à travers les filtres comme une opération singulièrement complexe.

Remarquons ici combien les dénominations: Chamberland B, F; Berkefeld V, N, W (viel durchlässig, normal, wenig durchlässig) sont peu précises pour des expériences qui doivent tendre à la rigueur mathématique. Malgré l'absence de corrélation qui vient d'être exposée, il serait, semble-t-il, beaucoup plus scientifique de désigner les bougies par leur débit dans un temps donné et pour une pression déterminée.

#### V. PASSAGE A TRAVERS LES FILTRES DU VIRUS DE RUE.

Toutes les expériences sur lesquelles était établi dans notre 1<sup>er</sup> mémoire le passage du virus rabique à travers les filtres avaient été faites avec du virus fixe. Le virus de rue ne se comporte pas différemment. On pouvait supposer a priori qu'avec le virus de rue, le chiffre d'atteintes des lapins serait moins considérable. Il n'en a rien été et il n'a été relevé entre les deux virus aucune différence appréciable.

Le 25 octobre, le bulbe d'un chien mort de rage est émulsionné finement dans 250 c. c. d'eau. L'émulsion est passée à travers Berkefeld V, et le filtrat inoculé à la dose de 1 c. c. à 1,5 c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. 4 animaux sont demeurés indemnes. Les 6 autres ont succombé à la rage du 16<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour après l'inoculation.

## VI. ALLONGEMENT DE LA PÉRIODE D'INCUBATION DANS LA RAGE DUE AU VIRUS FILTRÉ.

Il n'a pas été observé d'exception à cette règle que, chez les lapins inoculés avec du virus filtré, la période d'incubation n'est jamais inférieure à 10 jours. La grande majorité des animaux est prise le 11<sup>e</sup> ou 12<sup>e</sup> jour. Il a été noté par contre des incubations beaucoup plus longues : 14, 15 jours ; 16 jours dans une observation ; 19 jours dans une autre<sup>1</sup>. Ces faits constituant une analogie curieuse entre le virus de la rage et celui de la fièvre jaune, il paraît intéressant de les signaler avec quelque détail :

Exp. — Le 14 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. Filtration à travers une bougie Berkefeld V très perméable (débitant 769 c. c. d'eau à la minute sous une pression de 3 atmosphères). Inoculation du filtrat à la dose d'un c. c. sous la dure-mère de 7 lapins. 5 d'entre eux ont présenté les premiers symptômes de la rage le 24 janvier (10<sup>e</sup> jour) et sont morts le 26 (12<sup>e</sup> jour). Un 6<sup>e</sup> lapin se porte très bien jusqu'au 30 janvier (16<sup>e</sup> jour). C'est seulement à cette date qu'il présente un peu de tristesse et d'inappétence. Le 31 janvier, commencement de paralysie du train postérieur. La paralysie est manifeste le 1<sup>er</sup> février, et l'animal meurt le lendemain (19<sup>e</sup> jour). Un 7<sup>e</sup> lapin demeure en excellente santé jusqu'au 2 février (19<sup>e</sup> jour). A cette date, le train postérieur apparaît légèrement parésié. Le lendemain, la paralysie est plus accusée. Le 4 février, état stationnaire. Le 5, la paralysie progresse, mais très lentement. L'animal est couché le 6 au matin. Il meurt le 6 au soir, 5 jours après le début de sa maladie, 23 jours après l'inoculation. Le diagnostic de rage a été confirmé par deux trépanations.

## VII. RAGE ATYPIQUE DÉTERMINÉE PAR LE VIRUS FILTRÉ

On remarquera que, dans cette dernière observation, ce n'est pas seulement la période d'incubation, mais encore la maladie elle-même qui s'est trouvée allongée. La durée de la rage paralytique chez le lapin est de 48 heures, rarement de 72. Dans le cas précédent, la maladie n'a pas duré moins de cinq jours. Les faits de ce genre sont rares avec le virus filtré. La maladie a plutôt une tendance à être plus courte qu'avec le virus fixe. La paralysie peut exceptionnellement durer une journée seulement ou même quelques heures. D'autres fois, on est surpris de trouver un matin mort dans sa cage un lapin qui

1. Il va sans dire qu'il est exclusivement question ici des lapins trépanés avec du filtrat de virus fixe.



la veille au soir présentait seulement de l'inappétence, de la stupeur et une parésie douteuse du train postérieur. Or les passages viennent démontrer l'existence de la rage. Ces faits sont tout à fait exceptionnels. Néanmoins, ils sont utiles à connaître en raison des erreurs que leur ignorance pourrait entraîner.

Obs. I. — Un lapin qui a reçu le 12 janvier un c. c de filtrat Berkefeld V présente le 25 (13<sup>e</sup> jour) de l'inappétence, de la somnolence et une légère parésie du train postérieur. On le trouve mort le 26 au matin, 2 passages. Mort classique des lapins le 5 et le 6 février (10<sup>e</sup> et 11<sup>e</sup> jours).

Obs. II. — Un lapin reçoit le 10 janvier un c. c. de filtrat Berkefeld V. Le 22 janvier, alors que la plupart des animaux du même lot sont pris, il est encore très bien portant. Le 23 au matin, commencement de paralysie du train postérieur. Nous le revoyons à 4 heures du soir. Son état est stationnaire. Une demi-heure plus tard, on vient nous dire qu'il est mort. Nous le trouvons le corps raidi, les pattes repliées comme s'il avait succombé au cours d'une crise convulsive. Deux passages sont immédiatement pratiqués. Mort classique le 2 et le 3 février.

Obs. III. — Un lapin reçoit le 12 janvier 1 c. c. de filtrat Berkefeld V. Le 24, il ne mange pas et se laisse prendre dans sa cage sans tenter de s'enfuir, mais on ne constate aucune paralysie. Il est trouvé mort le 23 au matin, 2 passages. Mort le 1<sup>er</sup> et le 2 février (9<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours). Deux nouveaux passages. Les résultats sont encore positifs.

La conclusion à tirer de ces faits est qu'au cours des expériences sur la filtration du virus rabique, il est nécessaire de faire des passages avec le bulbe de tous les animaux qui succombent du 10<sup>e</sup> au 16<sup>e</sup> jour après l'inoculation. Il arrivera parfois — exceptionnellement il est vrai — que la rage sera démontrée expérimentalement dans des cas où, cliniquement, elle aurait pu à peine être soupçonnée.

#### VIII. PASSAGE A TRAVERS LES BOUGIES DE LA TOXINE RABIQUE

Nous avons signalé dans notre premier mémoire que parmi les animaux inoculés avec du filtrat Berkefeld V, quelques-uns, assez rares en vérité, succombent dans des délais un peu plus courts que les lapins rabiques et après avoir présenté les mêmes symptômes qu'eux, à cette différence près que la paralysie reste limitée au train postérieur. Encore est-elle incomplète. Cliniquement, étant donnés les faits décrits au paragraphe précédent, cet état est impossible à distinguer de la rage. L'autopsie laisse également dans le doute. Elle révèle le plus souvent, mai non

toujours, un envahissement précoce du sang et des organes par des microbes agoniques. Aucune autre particularité. Les passages seuls peuvent aider au diagnostic. Les lapins inoculés sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe meurent de méningite ou plus rarement survivent. Ceux qui ont été inoculés sous la peau ou dans les muscles demeurent indemnes... Voici un nouvel exemple de ce complexe symptomatique.

Le 24 janvier, 8 lapins reçoivent sous la dure-mère un c. c. de filtrat Berkefeld V (bougie débitant 432 c. c. par minute). Le 3 février (10<sup>e</sup> jour) un lapin présente un commencement de rage paralytique. La rage est classique le 4. Mort le 5. Le 3 février également, un 2<sup>e</sup> lapin montre de la tristesse, de l'inappétence. Le soir il existe un début de paralysie du train postérieur. Mort le 4 au matin. L'autopsie immédiatement pratiquée ne donne pas la cause de la mort. L'ensemencement du sang du cœur révèle la présence du staphylocoque blanc et du coli-bacille. Deux lapins sont inoculés par trépanation. L'un succombe le surlendemain à une méningite coli-bacillaire. L'autre survit. Il n'a présenté aucun symptôme de rage, non plus que deux jeunes lapins inoculés dans les muscles de la nuque.

Il paraîtra logique d'attribuer à l'action de la toxine rabique des faits de cette nature.

A côté de ces accidents qu'on pourrait, appeler : « spécifiques », car ils présentent les plus grandes analogies avec la rage, la toxine rabique paraît pouvoir en déterminer d'autres un peu plus fréquents, mais de nature plus banale. Parmi les lapins qui ont reçu sous la dure-mère 1 c. c. à 1 c. c. 1/2 de filtrat Berkefeld V, il en est quelques-uns qui maigrissent, se cachectisent et meurent finalement. Les passages sont négatifs. Il est d'autres animaux qu'on est surpris de trouver morts un matin, alors que la veille ils ne paraissaient nullement malades. A l'autopsie, aucune autre particularité qu'un envahissement précoce des organes et spécialement du système nerveux par des microbes d'infection agonique. Ces cas de mort ne se voient pas chez les lapins qui reçoivent sous la dure-mère du filtrat de cerveau sain. D'autre part, on les observe surtout le 8<sup>e</sup>, le 9<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> jours après l'inoculation. On est ainsi tenté



de les attribuer à l'action de la toxine rabique. Celli et de Blasi qui, au lieu d'émulsionner les cerveaux infectieux, les soumettent à une pression de 300 atmosphères avant de les filtrer, ont observé avec une fréquence beaucoup plus grande ces phénomènes cachectiques et ces morts subites. Dès lors, la toxine rabique ne serait-elle pas en partie intra-cellulaire? Il faut noter aussi la curieuse propriété que paraît posséder cette toxine de favoriser le développement des infections agoniques. Celli et de Blasi ont constaté comme nous la présence fréquente du coli et du protéus dans les organes des animaux qui succombent à des accidents de cette nature.

### IX. APPLICATIONS PRATIQUES

Au point de vue scientifique pur, il n'est pas indifférent de savoir que le virus rabique, dont la nature a tant exercé la sagacité des chercheurs, appartient à la classe des organismes ultra-microscopiques et que la rage doit prendre place à côté de la peste bovine, de la fièvre aphteuse, de la fièvre jaune et de la clavelée. Au point de vue pratique, la connaissance de la nature du virus rabique semble être au contraire de médiocre importance. La possibilité de la filtration du virus ne paraît devoir comporter que de rares applications dont les principales sont les suivantes :

1° *Isolement du virus rabique.* — Une fois démontré que la bougie Berkefeld V laissait passer le virus rabique dans des conditions où elle retenait les microbes « visibles » avec lesquels ce virus avait été artificiellement souillé, il était indiqué d'appliquer ce fait à l'isolement du virus rabique dans les circonstances où la souillure est non plus artificielle, mais naturelle. C'est ce qui a été réalisé dans les expériences suivantes<sup>1</sup>.

EXPÉRIENCE I. — Un lapin trépané avec du virus fixe meurt le 9 octobre. Son cerveau est enlevé et conservé à la température du laboratoire jusqu'au 10. Il est alors en pleine putréfaction. On émulsionne dans 300 c.c. d'eau et on filtre à travers Berkefeld V. Le filtrat est inoculé à la dose d'un c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. Un lapin présente des symptômes méningitiques le 15 octobre et meurt le 16 (lesensemencements du filtrat

1. Les trois premières de ces expériences ont été communiquées à la Société de Biologie à la séance du 21 novembre 1903.

ont montré qu'un micro-organisme petit, mobile, non déterminé, avait traversé la bougie). 7 autres lapins présentent le 24 octobre (11<sup>e</sup> jour) les premiers symptômes de la rage paralytique et succombent le 25 ou le 26. 2 animaux sont demeurés indemnes.

EXPÉRIENCE II. — Un chien inoculé sous la peau avec du virus fixe meurt le 18 octobre. Le bulbe est extrait le 20. Il commence à se putréfier. Il est laissé à l'étuve à 37° jusqu'au 21. Le 21, émulsion dans 300 c. c. d'eau. Filtration à travers Berkefeld V et inoculation sous la dure-mère de 8 lapins. Les ensemencements pratiqués avec le filtrat montrent que la bougie a laissé passer quelques unités d'un microbe fin et mobile. Néanmoins, aucun lapin ne présente de symptômes morbides les jours qui suivent l'inoculation. Le 31 octobre (10<sup>e</sup> jour), 4 lapins; le 1<sup>er</sup> novembre (14<sup>e</sup> jour), 4 autres lapins commencent à présenter des symptômes de rage. Tous succombent du 2 au 4 novembre. Il a été fait des passages qui ont fourni des résultats positifs classiques.

EXPÉRIENCE III. — Le 19 octobre, la municipalité nous adresse un chien de rue paralytique et par conséquent fort suspect de rage. Il meurt le lendemain. On laisse le cadavre se putréfier pendant 3 jours. Le bulbe est alors extrait. On le conserve à la température de la chambre pendant 24 heures encore. Le 24, émulsion dans 300 c. c. d'eau. Filtration à travers Berkefeld V. Trépanation de 10 lapins avec 1/2 à 1 c. c. du filtrat. Aucun développement en bouillon. 1 lapin meurt accidentellement le 6 novembre. Le 9 novembre (16<sup>e</sup> jour) début de la rage chez un lapin. Le 10 (17<sup>e</sup> jour), début chez un autre lapin; le 11 (18<sup>e</sup>), chez 3 lapins; le 12 (19<sup>e</sup>) chez 2 lapins; le 13 (20<sup>e</sup>), chez un lapin. Tous ces animaux succombent après 4 à 3 jours de maladie. 1 seul lapin est demeuré indemne.

EXPÉRIENCE IV. — Le 20 octobre, la municipalité nous adresse un chien trouvé paralysé dans la rue. Il meurt quelques heures après son arrivée. Le cadavre est laissé dans le chenil jusqu'au 23 octobre, date à laquelle on procède à l'ablation du bulbe. Celui-ci est mis à l'étuve à 22° jusqu'au lendemain. Le 24, il est émulsionné dans 200 c. c. d'eau et filtré à travers Berkefeld V. Le filtrat est ensemencé dans 12 tubes de bouillon. 6 sont laissés à la température de la chambre (aucun d'eux ne se trouble). 6 sont mis à l'étuve à 37°, 5 sont demeurés stériles. Dans le 6<sup>e</sup>, il s'est développé un *Proteus*. Le filtrat est inoculé d'autre part sous la dure-mère de 10 lapins. L'un d'eux est mort sans cause connue le 6 novembre (13<sup>e</sup> jour). Passages négatifs. 8 autres lapins ont contracté la rage du 16<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour et ont succombé du 18<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup>. 1 dernier lapin est demeuré indemne.

Grâce à la filtration, il est donc possible d'établir expérimentalement le diagnostic de rage en partant d'un virus putréfié, c'est-à-dire d'un virus impossible à inoculer sous les méninges ou dans la chambre antérieure et délicat à injecter sous la peau ou dans les muscles. Ce procédé pourra peut-être rendre service pour l'isolement du virus rabique dans quelques cas exceptionnels, mais il va de soi qu'on n'est pas plus



autorisé à attendre pour se soumettre au traitement anti rabique le résultat de cette méthode expérimentale que celui de l'inoculation sous-cutanée ou intra-musculaire. On remarquera qu'appliquée à la filtration de produits putréfiés, la bougie Berkefeld V s'est montrée un filtre assez imparfait<sup>1</sup>. Dans le cas particulier, le fait est sans importance, puisqu'il s'agit d'obtenir un diagnostic expérimental et non plus de démontrer que le microbe de la rage est un organisme ultra-microscopique.

2° *Obtention d'un sérum antirabique.* — M. Marie<sup>2</sup> a montré qu'il était possible d'immuniser très solidement le lapin et le cobaye à l'aide d'une seule injection d'un mélange de virus fixe et de sérum anti-rabique.

Ce mélange étant en outre dépourvu de virulence, puisqu'il se montre inoffensif pour les lapins qui en reçoivent dans le cerveau, on conçoit quel progrès serait réalisé pour la vaccination des grands animaux et de l'homme même si cette méthode venait à pouvoir leur être appliquée. De grandes quantités de sérum antirabique seraient alors nécessaires. Or, l'emploi du virus filtré paraît comporter pour l'obtention de ce sérum quelques avantages sur le virus fixe simplement dilué. L'état réfractaire du mouton vis-à-vis du virus rabique inoculé par voie intra-veineuse n'est pas absolu, et on peut — quoique exceptionnellement — voir l'animal succomber à la rage paralytique après une inoculation de 5 c. c. d'une dilution étendue. D'autre part, — indépendamment, cela va de soi, de toute introduction d'air ou de grumeaux — l'inoculation intra-jugulaire d'une dilution, même non concentrée de virus fixe, expose l'animal à la mort subite, ainsi que nous en avons recueilli deux observations. Aucun de ces accidents n'est à redouter avec le virus filtré. Un mouton peut recevoir dans la jugulaire, en une seule fois et sans le moindre inconvénient, de 150 à 200 c. c. de filtrat. Un de nos animaux a été saigné après avoir reçu 1,000 c. c. Les lapins inoculés avec le mélange de virus fixe et de sérum laissé 24 heures en présence sont morts avec un retard de 4 jours sur les témoins. Il avait été observé un retard identique avec le sérum de moutons ayant reçu dans la jugulaire 250 c. c. de virus dilué.

1. Ces bougies sont, du reste, données sans garantie par la maison Berkefeld.

2. A. MARIE. Immunisation par des mélanges de virus rabique et de sérum antirabique. *Soc. de Biologie*. Séance du 29 novembre 1903.

3° *Étude de la diffusion du virus rabique post mortem.* — Dans quels organes le virus rabique se localise-t-il? Quels sont, chez un homme ou un animal atteints de rage, les produits virulents? C'est une question sur laquelle les auteurs sont loin d'être d'accord. Ainsi, le pancréas, le lait, le sperme, les capsules surrénales, l'humeur aqueuse sont tour à tour considérés comme pourvus et dénués de virulence. De l'examen des documents sur lesquels s'élayent les opinions en présence, il semble résulter que les expérimentateurs qui ont eu le plus de résultats positifs sont ceux qui ont opéré avec des produits recueillis un temps plus ou moins long après la mort. Ceux qui se sont servis, au contraire, d'un matériel prélevé pendant la vie ou qui ont employé les organes d'un animal sacrifié prématurément n'ont obtenu le plus souvent que des résultats négatifs. Le virus rabique se généraliserait-il *post mortem*? Dans quels organes est-il susceptible de se répandre et dans quelle proportion? La filtration peut mieux que n'importe quel procédé répondre à ces questions. Seule, en effet, elle permet à la fois de se débarrasser des microbes d'infection agonique et d'utiliser la voie sous-dure-mérienne, de beaucoup la plus sensible et la plus précise.

Même en ce qui concerne la virulence de la salive et des glandes salivaires de l'homme atteint de rage, l'opinion des auteurs n'est pas unanime. Les résultats positifs obtenus par Bardach ont été attribués par Bordoni à la diffusion du virus après la mort. Tout récemment, Bertarelli et Volpino ont inoculé à 20 lapins de la salive, puis une émulsion des glandes perotide, sous-maxillaire et sublinguale d'un enfant mort de rage, et ils ont obtenu des résultats négatifs. Le fait suivant cadre avec celui de ces auteurs<sup>1</sup> :

Le 22 octobre 1903, six personnes originaires du vilayet de Salonique sont grièvement mordues à la face et aux mains par un loup enragé. Elles n'arrivent à l'Institut antirabique que le 4 novembre, soit 13 jours après la morsure. Le 17 novembre (14<sup>e</sup> jour du traitement), apparition chez deux d'entre elles des premiers symptômes de la rage. Pendant toute la journée du 17 et la plus grande partie de celle du 18, on prie les malades de cracher dans un bocal spécial. Le 19, ces deux expectorations sont mélangées, délayées dans 100 c. c. d'eau et filtrées à travers Berkefeld V. Le filtrat est copieusement ensemencé dans 10 tubes de bouillon, 5 sont mis à l'étuve à

1. Cette observation a été communiquée à la Société de Biologie à la séance du 23 janvier 1904.

37°. 5 autres sont laissés à la température de la chambre. Aucun développement. Le filtrat est inoculé d'autre part à la dose de 1 c. c. sous la dure-mère de 8 lapins. Tous ont survécu. Deux autres lapins, inoculés sous la peau avec 2 et 3 c. c. d'émulsion de salive non filtrée, sont également indemnes après trois mois.

La question que soulève cette expérience, comme aussi toute la question de la diffusion du virus rabique *post mortem*, ne pourra être réglée, cela va de soi que par un très grand nombre de recherches. Notre but est, ici, de poser le problème.

#### X. VIRUS RABIQUE FILTRÉ ET CORPUSCULES DE NÉGRI

Un dernier point reste à examiner. Le passage du virus rabique à travers les filtres est-il compatible avec le parasite trouvé dans la rage par Negri? Cet auteur, dont les travaux ont été confirmés par Guarneri, Daddi, Celli et de Blasi, Bosc, Bertarelli et Volpino, etc., a décrit, comme on sait, des inclusions protoplasmiques spéciales dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon, les cellules de Pürkinje du cervelet, les grandes cellules des circonvolutions cérébrales des sujets morts de rage. Ces inclusions ne se rencontreraient dans le système nerveux ni des sujets sains, ni des individus ayant succombé à une autre maladie. Elles seraient le Protozoaire spécifique de la rage. Ce Protozoaire, que la méthode de Mann colore en rouge vif, est de taille et de forme très variables. Le plus souvent, il est rond ou ovale avec un diamètre de 4 à 10  $\mu$ , mais il est susceptible de prendre des dimensions beaucoup plus considérables (20 à 25  $\mu$ ) comme aussi beaucoup plus réduites (1/2 à 1  $\mu$ ). Il semble que les dimensions du parasite puissent être plus petites encore. A côté des inclusions protoplasmiques, le microscope montre dans les cellules nerveuses de fines granulations, à peine visibles, se colorant en rouge par le Mann. Celles-ci ne sont peut-être que des modalités du même parasite. Pour Schuder, le fait que le virus rabique traverse les filtres est incompatible avec le rôle pathogène de ces formations. Après avoir établi que le virus rabique passe à travers son filtre spécial qui retient le vibron cholérique, il conclut que la taille du parasite de la rage est au-dessous des dimensions susceptibles d'être révélées par les microscopes ordinaires. Par conséquent, le parasite décrit par Negri n'est nullement l'agent spécifique de la maladie. Ce n'est



pas un Protozoaire, mais une inclusion protoplasmique banale. Celli et de Blasi protestent contre cette opinion. Ils font remarquer que, si les formes volumineuses et même moyennes du Protozoaire de Négri sont nécessairement retenues par les filtres, il peut n'en être plus de même des formes petites. De fait, ils ont retrouvé des inclusions protoplasmiques identiques chez des animaux qui avaient succombé à une rage déterminée par du virus filtré. Pareille constatation a été faite également par Négri lui-même<sup>1</sup>... Une question analogue se pose, comme on sait, à propos de la clavelée et de quelques autres affections. Ainsi, M. Bosc a émis l'opinion que les formes très petites du Protozoaire qu'il a décrit dans la clavelée étaient parfaitement capables de traverser les filtres. D'où les propriétés infectieuses du filtrat, découvertes par Borrel. Nous n'avons aucune compétence pour prendre position dans cette question si difficile de l'extrême polymorphisme de certains Protozoaires et de la nature véritable des inclusions protoplasmiques décrites aujourd'hui dans un assez grand nombre de maladies. Contre l'hypothèse parasitaire des corpuscules de Négri, nous ferons seulement observer l'absence de corrélation entre leur distribution et celle du virus rabique. C'est dans le bulbe et la protubérance qu'existe — la chose est classique — la plus grande quantité de virus. Or, à ce niveau, les parasites sont absents pour la majorité des auteurs, extrêmement rares pour les autres. Au contraire, ces corpuscules se rencontrent surtout dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon et de l'écorce cérébrale, dans les cellules de Purkinje du cervelet, là où le virus rabique est relativement peu abondant.

Une petite particularité de nature à faire admettre, par contre, que les « microbes invisibles » constituent bien un groupe spécial, et que la rage doit figurer dans ce groupe, c'est la façon identique dont ces micro-organismes d'une part, le virus rabique de l'autre réagissent à la température. MM. Marchoux et Simond<sup>2</sup> ont fait remarquer que les organismes ultra microscopiques offraient tous à la chaleur une résistance très faible. Ainsi le sang des malades atteints de fièvre jaune perd toute

1. NEGRI, communication personnelle.

2. MARCHOUX, et SIMOND, La fièvre jaune. *Bulletin de l'Institut Pasteur* du 15 janvier 1904.

virulence par un chauffage à 55° de 10 minutes (Reed et Carroll) de 5 minutes (Marchoux, Salimbeni et Simond). Le virus claveleux est détruit en 3 minutes à 56°-58° (Nocard). La virulence de la lymphé aphteuse disparaît après chauffage à 50° pendant 15 minutes. Le chauffage à 52° stérilise en une demi-heure le virus pestique. De même le chauffage à 40 pendant quelques heures (Babès) ou à 47°-48° pendant 10 et même 5 minutes (Galtier) fait perdre au virus rabique toute son activité. Il y a dans ce fait un argument en faveur du rattachement de la rage à un groupe morbide spécial, bien distinct des affections à Protozoaires.

Constantinople, le 20 février 1904.

---

# Recherches sur la coagulation de l'amidon.

PAR MM. A. FERNBACH ET J. WOLFF

(PREMIER MÉMOIRE)

Malgré les recherches très nombreuses auxquelles a donné lieu l'étude de l'amidon, nous ne savons encore que fort peu de chose sur sa constitution chimique et sur son mode de formation. On doit donc attacher une grande importance à toute observation capable de jeter un peu de lumière sur ce sujet si complexe. L'un de nous, au cours des travaux qu'il poursuit depuis quelques années sur la saccharification de l'amidon par l'amy-lase du malt, a eu l'occasion d'étudier quelques influences qui favorisent ou retardent la liquéfaction et la transformation ultérieure de l'empois<sup>1</sup>. A la suite de ces recherches, nous avons été conduits à nous préoccuper du phénomène inverse de la liquéfaction de l'empois, c'est-à-dire du retour de l'amidon solubilisé vers la forme solide, et nous avons réussi à réaliser ce retour à l'aide d'une diastase qui semble être aussi répandue dans la nature que l'amy-lase elle-même. Nous exposons ci-après la première partie de nos recherches sur cette diastase, à laquelle, conformément aux règles de la nomenclature généralement adoptée, nous donnerons le nom d'*amyl-coagulase*.

## I

Si la formation de l'amidon solide dans les cellules végétales est un phénomène diastasique, on doit naturellement s'attendre à rencontrer la diastase qui provoque le phénomène au moment où l'amidon apparaît dans le végétal. Nous avons donc été conduits à étudier tout d'abord des céréales en voie de développement et dans lesquelles le grain est encore vert et à l'état de *lait*. Dans la plupart des cas, nos prévisions se sont trouvées réalisées.

D'une manière générale, nous avons fait agir des macérations du grain à étudier sur de la fécule, préalablement solubi-

1. Ces recherches ont été exposées dans une conférence faite par M. A. Fernbach à l'Institut Pasteur et ont été publiées dans les *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 1899, 5 septembre, 10 et 25 octobre.



lisée par chauffage dans la vapeur d'eau sous pression, et nous nous occuperons presque exclusivement dans ce mémoire de ce qui a trait à la fécule de pommes de terre, réservant pour un mémoire ultérieur l'étude de la manière dont se comportent les amidons d'une autre origine.

Disons d'abord quelques mots de la manière dont nous avons préparé nos solutions d'amidon soluble. De la fécule de pommes de terre du commerce, qu'il est facile de se procurer à l'état de pureté suffisante (toutes nos expériences ont été faites avec le même lot de fécule, bien que, dans quelques cas, nous nous soyons assurés que d'autres échantillons conduisaient exactement aux mêmes résultats), a été transformée en empois à 2 0/0 d'amidon réel, et cet empois a été chauffé dans un autoclave pendant un temps variant entre 3 et 4 heures à une température voisine de 135°-140°. Immédiatement au sortir de l'autoclave, le produit obtenu, ramené au volume primitif et filtré, a été réparti dans de petits ballons, par portions de 100 c. c., qu'on a stérilisés en chauffant pendant 1/4 d'heure à 120°. Nous avons ainsi fait une provision d'amidon soluble permettant d'exécuter un grand nombre d'essais portant tous sur une matière première toujours comparable à elle-même.

Quant aux macérations de grains, elles ont été préparées en broyant les grains avec de l'eau et du sable, et filtrant l'extrait; dans un certain nombre de cas, on a stérilisé le liquide obtenu en le faisant passer au travers d'une bougie de porcelaine. Nous avons pu ainsi contrôler, par des expériences aseptiques, les résultats obtenus avec la macération non filtrée, agissant en présence de chloroforme comme antiseptique.

Comme il fallait s'y attendre, nos premières expériences n'ont pas conduit tout de suite au résultat désiré, et nous avons dû enregistrer un grand nombre d'essais négatifs avant d'avoir trouvé les conditions qui permettent de réussir à coup sûr.

Si on introduit dans une série de tubes à essai, renfermant chacun une même quantité d'amidon soluble préparé comme il a été dit plus haut, des quantités croissantes de macération d'une céréale verte, par exemple d'avoine, et qu'on abandonne ces tubes, additionnés de quelques gouttes de chloroforme, à la température ordinaire, on observe, au bout d'un temps plus ou moins long, l'apparition d'un trouble qui est d'abord léger et

qui va en s'accroissant de plus en plus. Le temps au bout duquel ce trouble apparaît peut varier dans de très larges limites, et, dans nos premières expériences, il ne s'est souvent manifesté qu'au bout de 24 ou même 48 heures; quelquefois même, nous ne l'avons pas observé. La proportion de macération employée joue, en effet, un rôle capital dans la rapidité d'apparition du phénomène, observation qui semble toute naturelle lorsqu'il s'agit d'un phénomène diastasique, et qui serait superflue ici si le phénomène ne se compliquait pas de circonstances particulières sur lesquelles nous attirerons plus loin l'attention.

Lorsqu'on opère comme nous venons de le dire sur une série de tubes recevant des quantités croissantes de macération, il arrive que deux ou trois tubes successifs se troublent à peu près au bout du même temps, alors que ceux qui les précèdent dans la série se troublent beaucoup plus tard, les premiers pouvant même rester inaltérés si la proportion de macération a été insuffisante. Les tubes qui suivent dans la série ceux où il y a eu coagulation ne se troublent pas non plus; ils subissent néanmoins une transformation qui se traduit par la disparition complète de l'opalescence que présentent toujours à froid les solutions d'amidon soluble. Nous n'avons pas tardé à reconnaître que, dans ces derniers tubes, l'amidon disparaissait peu à peu par saccharification; que dans tous les autres tubes où s'était manifesté le trouble il y avait également une saccharification, d'autant moins avancée qu'on remontait plus en arrière dans la série, et que cette saccharification était due à la présence d'amylase. Cette action saccharifiante progressive était facile à constater aussi bien par la réaction avec l'iode qu'à l'aide de la liqueur de Fehling.

Toutes les macérations sur lesquelles nous avons expérimenté se sont comportées de même: chaque fois que nous avons pu mettre en évidence l'amylo-coagulase, nous avons constaté la présence d'amylase. Le fait s'est vérifié pour des macérations de blé vert, d'avoine verte ou d'orge verte de diverses provenances, de feuilles de trèfle. Exceptionnellement nous n'avons pas réussi à déceler ni diastase coagulante ni amylase dans un échantillon de maïs vert, qui n'a sans doute pas été étudié au moment favorable<sup>1</sup>.

1. Cette explication nous est suggérée par un fait analogue que nous avons

Ayant ainsi constaté la présence simultanée et constante de la propriété coagulante et de la propriété saccharifiante, nous avons été conduits à rechercher si l'amylo-coagulase ne se trouverait pas associée à l'amyrase dans le malt, et nous l'avons en effet rencontrée dans le malt vert, comme dans le malt touraillé. Nous avons ainsi sous la main un produit qu'il est facile de se procurer et de conserver semblable à lui-même, de sorte que nous nous sommes décidés à poursuivre l'étude de la diastase coagulante en nous servant de macérations de malt, à l'aide desquelles il était possible de faire des expériences comparatives et d'établir les conditions précises dans lesquelles le phénomène de la coagulation de l'amidon se produit à coup sûr.

## II

Nous décrivons ci-après des expériences destinées à préciser les conditions nécessaires à la coagulation de l'amidon.

10 grammes de malt <sup>1</sup> finement moulu sont mis à macérer pendant 4 heures au minimum, à la température ordinaire, dans 100 c. c. d'eau. On agite de temps à autre pendant la macération. Le liquide filtré est étendu de trois fois son volume d'eau.

Dans une série de tubes renfermant chacun 10 c. c. d'amidon soluble à 2 0/0 préparé comme il a été dit plus haut, on ajoute des volumes croissants de cet extrait de malt dilué, en commençant par 0,05 c. c. <sup>2</sup>, et augmentant par fraction de 0,05 c. c. Deux séries de tubes semblables sont placées, l'une à la température de 22°, l'autre à la température de 8°. Chaque série renferme plusieurs tubes témoins additionnés de la solution diastasique préalablement bouillie <sup>3</sup>.

eu l'occasion d'observer pendant la germination du riz. Nous avons constaté que la production d'amyrase dans cette céréale ne peut être mise en évidence qu'à un stade bien déterminé de sa germination et qu'à ce moment il y en a assez pour saccharifier tout l'amidon du grain; le grain de riz étudié plus tôt ou plus tard ne renferme plus que des quantités d'amyrase presque insignifiantes.

1. Le malt qui nous a servi dans la majeure partie de nos expériences était du malt simplement séché sur le plateau supérieur de la touraille. Il renfermait 12 0/0 d'humidité et avait un pouvoir diastasique (déterminé par la méthode de Lintner et rapporté au grain sec) s'élevant à 80.

2. Nous avons employé pour ces mesures un compte-gouttes Duclaux, dont la goutte mesure 1/20<sup>e</sup> de centimètre cube. Comme il s'agissait de mesurer un extrait de malt très dilué, la mesure peut être considérée comme aussi précise que s'il s'était agi d'eau distillée.

3. Dans toutes les expériences qui n'ont pas été faites aseptiquement avec des tubes stériles et de la solution diastasique stérilisée par filtration, on a toujours ajouté quelques gouttes de chloroforme. Nous nous sommes assurés que le chloroforme n'exerce aucune influence sur la marche du phénomène.



A la température de 22° on constate, au bout de 15 heures, une coagulation légère dans les tubes qui ont reçu 0,1 c. c. et 0,15 c. c. d'extrait de malt.

A la température de 8°, au bout du même temps, tous les tubes se sont troublés abondamment, à partir de celui qui a reçu 0,1 c. c. d'extrait de malt, jusqu'au dernier, qui en a reçu 0,35 c. c. Il ne s'est produit aucun changement dans les tubes témoins.

En maintenant à 8° le premier tube, qui ne s'est pas troublé au bout de 15 heures, on constate qu'il finit également par donner une coagulation.

La conclusion à tirer de ces expériences est que, toutes choses égales d'ailleurs, la coagulation se produit mieux à 8° qu'à 22°. Nous essaierons plus loin de préciser l'influence de la température. On voit aussi que pour une température donnée une quantité minimum de solution diastasique est nécessaire à la production du phénomène, et que si on dépasse une certaine dose de solution diastasique, la coagulation ne se produit plus.

On peut déduire des expériences qui viennent d'être rapportées et d'autres qu'il est inutile de citer ici que, pour produire à coup sûr la coagulation de 100 c. c. d'amidon soluble à 2 0/0, il faut un volume d'extrait de malt dilué, préparé de la manière indiquée plus haut, compris entre 1 c. c. et 1,5 c. c., si on opère à 22°, et entre 1 c. c. et 8 c. c. si on opère à 8°. Les limites entre lesquelles on peut se mouvoir sont d'autant plus étendues que la température est plus basse.

Après avoir précisé ainsi les conditions nécessaires et suffisantes pour produire une coagulation, nous avons à démontrer qu'il s'agit bien ici d'une action diastasique.

La première preuve d'une action diastasique est déjà fournie par les expériences citées plus haut, puisque nous avons constaté que la macération bouillie a perdu tout pouvoir coagulant. D'autre part, l'amylo-coagulase partage avec l'amyrase la propriété de résister à la chaleur sèche, puisque, comme nous l'avons dit, on la retrouve dans le malt touraillé. L'ébullition n'est pas nécessaire pour faire disparaître la propriété coagulante de l'extrait de malt. Voici un tableau qui indique ce que cette propriété devient à diverses températures :

70°	2 minutes	Destruction totale
65°	5 —	—
64°	5 —	—
63°	5 —	—
60°	1/4 d heure	Diastase intacte

La température de destruction, dans l'extrait de malt, est donc comprise entre 60° et 63°.

Comme c'est le cas pour un grand nombre de diastases, et en particulier pour l'amylase, le passage au travers d'un filtre de porcelaine diminue considérablement les propriétés coagulantes de l'extrait de malt.

Voici encore une observation qui s'accorde avec l'idée d'une action diastasique. En ajoutant, comme dans les expériences décrites plus haut, des quantités croissantes d'extrait de malt dans une série de tubes contenant chacun 10 c. c. d'amidon soluble, nous avons observé que le commencement de la coagulation se manifestait au bout des temps indiqués ci-après :

Volumes d'extrait de malt employés.	Quantités relatives d'extrait de malt.	Temps.
0 c. c. 05	1	46 h.
0 c. c. 15	3	9 h.
0 c. c. 30	6	5 h.
0 c. c. 45	9	4 h.
0 c. c. 60	12	2 h. 1/2

On ne peut pas s'attendre, comme on l'observe pour la présure, à une proportionnalité inverse entre le temps et les quantités de diastase. Pour la présure, cette relation n'est qu'approchée, parce que la mesure du temps de coagulation est grossière. Ici la mesure est encore plus inexacte et n'a, d'ailleurs, été faite qu'en observant le moment où *commence* la coagulation; le phénomène dure toujours un certain temps, et sa fin est impossible à saisir avec précision. De plus, il se complique de la présence de l'amylase. Il n'en apparaît pas moins très nettement que le phénomène est d'autant plus lent à se produire qu'il y a moins de solution diastasique employée. En outre, si on détermine la quantité d'amidon précipité lorsque la coagulation est terminée, quand celle-ci est lente, comme dans les expériences ci-dessus, on trouve que ces quantités variables de solution diastasique ont produit des poids de précipité sensiblement égaux.

On trouvera plus loin des expériences destinées à établir l'influence de la concentration de l'amidon, expériences qui

montrent que le phénomène est d'autant plus rapide que la solution d'amidon est plus concentrée. Mais nous devons attirer de suite l'attention sur ce fait que la concentration n'est pas le seul facteur qui influe sur la rapidité de la coagulation, et que l'état de l'amidon joue aussi un rôle capital. Lorsqu'on chauffe de l'empois à l'autoclave, sa précipitation par l'amylo-coagulase devient d'autant plus lente que la température a été plus élevée et que le chauffage a été plus prolongé; ce qui revient à dire que l'amidon est d'autant plus facilement coagulable que sa solubilisation a été poussée moins loin. Voici, en effet, des expériences dans lesquelles nous avons réalisé des coagulations beaucoup plus rapides que celles mentionnées plus haut, en partant également de solutions à 2 0/0 d'amidon réel, chauffées à l'autoclave à des températures moins élevées. Ces coagulations ont été faites à la température de 16°, sur 10 c. c. de solution d'amidon, avec de l'extrait à 10 0/0 d'un malt dont le pouvoir diastasique (rapporté au grain sec) était 50. Les chiffres de la colonne A correspondent à de l'empois chauffé à 115° pendant 10 minutes, et ceux de la colonne B au même empois chauffé à 130° pendant 3 heures.

Volume d'extrait de malt.	Quantités relatives d'extrait de malt.	Temps au bout duquel la coagulation commence.	
		A	B
0 c. c. 05	1	98 minutes	170 minutes
0 10	2	93 —	165 —
0 15	3	80 —	140 —
0 20	4	65 —	125 —
0 25	5	50 —	110 —
0 30	6	45 —	105 —

Contrairement à ce que nous avons signalé dans l'expérience rapportée plus haut, où les temps de coagulation ont été relativement longs, nous avons constaté, dans les expériences que nous venons de citer, que le coagulum est d'autant moins abondant que la quantité de solution diastasique employée a été plus grande, ce qui pourrait sembler paradoxal s'il s'agissait ici d'une diastase agissant toute seule, et trouvera son explication plus loin, lorsque nous parlerons de l'antagonisme de l'amylo-coagulase et de l'amylyase.

L'aspect de l'amidon coagulé varie suivant les conditions dans laquelle sa précipitation s'est faite. Si elle a lieu rapidement, on peut facilement suivre la marche du phénomène et



d'autant mieux que la solution d'amidon est plus concentrée : on voit d'abord apparaître un louche qui va en augmentant de plus en plus, et qui ne tarde pas à se résoudre en flocons qui envahissent peu à peu toute la masse, et qui lui donnent l'apparence du lait caillé.

Si la coagulation a lieu très lentement, c'est-à-dire dans une solution d'amidon diluée et avec une trace de diastase, auquel cas il devient indispensable d'opérer aseptiquement, il se forme peu à peu un précipité pulvérulent blanc qui se dépose à la longue et que la moindre agitation suffit à remettre en suspension. Dans le premier cas, on trouve au microscope, en faisant l'examen au moment où il ne reste plus d'amidon en solution, une agglomération de granules punctiformes, très peu réfringents, et qu'on n'arrive à distinguer facilement que si on les colore par l'iode. Dans le second cas, ces granules sont mélangés d'une proportion plus ou moins considérable d'amas volumineux, formés par des granules beaucoup plus gros, parmi lesquels on en rencontre souvent qui présentent une forme sphérique ou ovoïde rappelant par leurs dimensions les grains les plus petits de la fécule de pomme de terre.

### III

La présence simultanée de l'amylo-coagulase et de l'amylase, que nous avons toujours constatée dans les macérations que nous avons étudiées, devait naturellement faire rechercher si l'action coagulante ne pourrait pas être attribuable à une réversibilité de l'action liquéfiant de l'amylase. L'observation qui suit nous a amenés à rejeter cette hypothèse. Ainsi qu'on l'a vu plus haut, le pouvoir coagulant de l'extrait de malt disparaît lorsqu'on chauffe cet extrait à 63° pendant 5 minutes, alors que ce traitement laisse intact le pouvoir liquéfiant de ce même extrait ; on sait même, depuis les travaux de Pottevin, que ce pouvoir liquéfiant subsiste encore lorsque l'extrait de malt a été chauffé pendant 1/4 d'heure à 80°. Il ne peut donc être question d'une identité entre les deux diastases.

Mais, comme ces deux diastases sont toujours présentes en même temps, il en résulte un antagonisme qui rend l'étude de la coagulase particulièrement difficile. Les essais que nous avons

rapportés plus haut font voir que des modifications minimales des conditions expérimentales empêchent ou permettent la coagulation. Cette contingence des résultats s'explique facilement par l'antagonisme, dont nous venons de parler, entre l'amylo-coagulase et l'amylase. Plus la température s'élève, et plus l'action de l'amylase se trouve favorisée; cette action saccharifiante diminue de plus en plus la concentration de la solution d'amidon, et il s'ensuit que l'action de l'amylo-coagulase est de plus en plus retardée, car, ainsi que nous le montrerons plus loin, l'action de cette dernière diastase est, toutes choses égales d'ailleurs, d'autant plus facile que les solutions d'amidon sont plus concentrées. Nous pouvons également prévoir que toute influence qui tendra à restreindre l'action de l'amylase sans gêner celle de la coagulase permettra à celle-ci de s'exercer plus librement, et, à défaut de toute méthode de séparation des deux diastases, c'est là le seul moyen que nous ayons à notre disposition pour dissocier leurs actions.

Quelques données expérimentales suffiront pour éclairer les considérations qui précèdent. Nous avons déjà vu réussir à 8° des coagulations d'amidon à 2 % qui, toutes choses égales d'ailleurs, ne se produisent plus à 22°. Si on élève la température, jusqu'à 26° par exemple, il devient impossible de réussir les coagulations que nous pouvions produire à 22°. C'est ainsi que s'explique l'irrégularité de nos premières expériences, qui, faites pendant l'été, ont donné des résultats tantôt positifs, tantôt négatifs, suivant que la température était plus ou moins favorable.

Cet antagonisme des deux diastases explique encore pourquoi il sera impossible de déterminer avec précision l'optimum de température de l'amylo-coagulase tant que nous n'aurons pas trouvé un moyen d'arrêter complètement l'action de l'amylase sans nuire d'une manière sensible à l'action de la coagulase.

Il ne faudrait cependant pas conclure de ce que nous venons de dire à propos de l'antagonisme de l'amylo-coagulase et de l'amylase que l'une de ces diastases soit capable de défaire ce que l'autre a fait. Nous reviendrons plus tard sur ce point, mais nous pouvons dire tout de suite que l'amidon solubilisé par l'amylase ne se prête pas à la coagulation aussi facilement que

l'amidon solubilisé sous pression, bien que, à d'autres points de vue, ces deux amidons se comportent d'une manière identique.

Les essais, faits à diverses températures, que nous avons rapportés plus haut, nous ont montré que l'action coagulante l'emporte sur l'action saccharifiante à mesure que la température s'abaisse. Il était indiqué de rechercher d'autres moyens capables de favoriser l'action de l'amylo-coagulase, et nous nous sommes demandé si nous ne pourrions pas trouver ces moyens dans l'étude de l'influence des acides, des alcalis ou de certains sels.

Dans cette étude nous avons rencontré une difficulté résultant de la lenteur avec laquelle la coagulation se produit lorsqu'on opère à température basse sur des solutions d'amidon à 2 0/0 solubilisé à haute température, que nous avons employé exclusivement au début de nos recherches. Cette lenteur nous eût obligés à opérer toujours aseptiquement, ce qui est une complication lorsqu'il s'agit de faire simultanément un grand nombre d'expériences; d'ailleurs ces expériences aseptiques sont encore beaucoup plus lentes, parce qu'on opère avec une solution diastasique dont l'activité est considérablement réduite par la filtration. Nous avons donc été conduits à opérer sur des solutions d'amidon soluble renfermant entre 4 et 4, 5 0/0 d'amidon réel. Disons de suite en quoi la coagulation de ces solutions concentrées diffère de celle qu'on observe sur les solutions diluées.

Ces solutions d'amidon à 4-4, 5 0/0 sont généralement beaucoup plus épaisses et opalescentes que la solution à 2 0/0, et elles se prennent en gelée spontanément si on les abandonne à elles-mêmes pendant 24 ou 48 heures<sup>1</sup>, phénomène qui peut aussi se produire dans les solutions à 2 0/0, mais au bout d'un temps très long, qui est rarement inférieur à un mois. Cette tendance à la solidification ne gêne pas l'étude de l'action de l'amylo-coagulase, puisque les coagulations produites dans ces solutions concentrées ont lieu au bout d'un temps très court, si on augmente suffisamment la proportion de solution diastasique. Ces coagulations présentent d'ailleurs l'avantage de se produire très bien à la température ordinaire, entre 15° et 25°.

1. La solution se conserve à l'état liquide d'autant plus longtemps qu'elle a été chauffée plus haut et que le chauffage a été plus prolongé. Nous avons pu conserver des solutions pendant 4 ou 5 jours avant qu'elles se prennent en gelée.



Pour 10 c. c. de cet amidon à 4-4,5 0/0, nous avons pu employer 0,5 c. c., d'une macération de malt à 10 00, c'est-à-dire 20 fois plus que dans les premières expériences que nous avons citées. Dans ces conditions la coagulation se produit au bout d'une demi-heure environ, et le contenu des tubes se prend très rapidement en grumeaux volumineux.

C'est en opérant de cette manière que nous avons fait quelques essais relatifs à l'influence de la réaction acide et de la réaction alcaline. Nous avons étudié ainsi l'influence de l'acide acétique et de l'acide sulfurique, ainsi que l'influence de la soude. Voici un tableau qui résume les résultats obtenus:

Corps étudié	Dose en millièmes (Milligr. p. litre).	Effet.
—	—	—
Acide acétique	1	Aucun
—	10	Retard sensible
—	100	Faible coagulation
Acide sulfurique	75	Pas de coagulation
Soude	20	Retard sensible
—	80	Retard de quelques heures
—	200	Pas de coagulation

Nous considérons les expériences dont nous venons de parler comme étant surtout des expériences d'orientation, et nous nous proposons de les reprendre en les étendant à un certain nombre de sels et à de l'amidon à divers états de solubilisation<sup>1</sup>. Nous avons cependant été conduits à essayer l'influence des sels de chaux, qui, comme on le sait, jouent dans tous les phénomènes de coagulation étudiés jusqu'ici un rôle capital. Mais jusqu'à présent les résultats de nos essais ont été négatifs.

La conclusion qui se dégage des expériences ci-dessus, c'est que l'amylo-coagulase subit, comme l'amyase, l'influence de la moindre trace d'acide ou d'alcali *libre*. Elle apparaît, dans les conditions où nous venons d'opérer, comme notablement moins sensible à l'action des alcalis que l'amyase. Cette constatation nous a naturellement conduits à essayer l'influence de la soude pour arriver à dissocier l'action des deux diastases simultanément présentes.

Nous pouvions prévoir, d'après ce que nous avons dit plus

1. Nous avons, en effet, eu l'occasion de constater que les doses qui sont gênantes pour la coagulation d'un certain amidon peuvent devenir favorables lorsque l'état de solubilisation de ce même amidon est différent. Il y a là une influence évidente de l'état physique, dont nous avons déjà cité un exemple quand nous avons parlé des temps de coagulation, état physique qui, lorsqu'il s'agit d'un ensemble aussi complexe que l'amidon, joue un rôle aussi important dans l'action diastasique que la diastase elle-même.

haut, qu'en retardant ainsi l'action de l'amylase, nous augmenterions la quantité d'amidon qui échappe à la saccharification, et que, par contre-coup, nous aurions une plus forte proportion d'amidon coagulé.

Voici les résultats de quelques expériences qui établissent nettement l'influence favorisante de la soude, expériences dans lesquelles nous avons également, dans quelques cas, fait varier la proportion de solution diastasique employée. Toutes ces expériences ont été faites à la température du laboratoire, 15-20°.

EXPÉRIENCE I. — Deux ballons, A et B, renfermant 50 c. c. d'amidon soluble, à 4 0/0 d'amidon réel, préparé à 130° pendant 2 heures, ont été additionnés chacun de 2 c. c. 5 d'extrait de malt à 10 0/0; le ballon B a reçu en plus 1 c. c. de soude décimale, représentant 80 millionièmes.

	A	B
Volume de solution d'amidon . . . . .	50 c. c.	50 c. c.
Poids de l'amidon primitif . . . . .	2 gr.	2 gr.
Volume d'extrait de malt à 10 0/0 . . . . .	2 c. c. 5	2 c. c. 5
Soude en millionièmes . . . . .	Néant	80
Poids de coagulum, en milligrammes . . . . .	238	483
Proportion centésim. d'amidon coagulé . . . . .	14,4 0/0	24,15 0/0

EXPÉRIENCE II. — Cette expérience a été faite comme la précédente, mais en variant les quantités de solution diastasique.

	A	B	C
Volume de solution d'amidon . . . . .	50 c. c.	50 c. c.	50 c. c.
Poids de l'amidon primitif . . . . .	2 gr. 22	2 gr. 22	2 gr. 22
Volume d'extrait de malt à 10 0/0 . . . . .	2 c. c. 5	0 c. c. 5	0 c. c. 5
Soude en millionièmes . . . . .	Néant	Néant	80
Proportion centésim. d'amidon coagulé . . . . .	18,5 0/0	23,8 0/0	26,5 0/0

#### EXPÉRIENCE III.

	A	B	C	D	E
Volume de solution d'amidon . . . . .	50 c. c.	50 c. c.	50 c. c.	50 c. c.	50 c. c.
Poids de l'amidon primitif . . . . .	2 gr. 25	2 gr. 25	2 gr. 25	2 gr. 25	2 gr. 25
Volume d'extrait de malt à 20 0/0 . . . . .	2 c. c. 5	—	—	—	—
— — — — — à 10 0/0 . . . . .	—	2 c. c. 5	2 c. c. 5	1 c. c.	1 c. c.
Soude en millionièmes . . . . .	80	Néant	80	Néant	80
Propor. cent. d'amidon coagulé . . . . .	17,42 0/0	13,4 0/0	20,70 0/0	16,45 0/0	21,04 0/0

Ces expériences montrent nettement l'influence favorable de la soude à la dose de 80 millionièmes. Nous voulons dire par là, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, que la soude favorise le phénomène de la coagulation, mais cette affirmation ne préjuge rien sur ce que serait l'effet de la soude si l'amylase agissait seule.

Elles font voir, en outre, l'influence des quantités de solution diastasique : les ballons A, dans les trois expériences, et le ballon B, dans l'expérience III, ont reçu des quantités de macération exagérées, de sorte que l'amylase a pris une part

importante au phénomène et que la proportion de coagulum s'en est trouvée réduite.

Nous ajoutons ci-après les chiffres relatifs à deux séries d'expériences dans lesquelles nous avons étudié l'influence de la température et celle du temps.

## EXPÉRIENCE IV.

	A	B	C
	Températures.	Températures.	Températures.
	15°	45°	8°
Volume de solution d'amidon. . . . .	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.
Poids de l'amidon primitif . . . . .	2 gr. 03	2 gr. 03	2 gr. 03
Volume d'extrait de malt à 10 0/0 . . . .	1 c.c.	0 c.c. 5	1 c.c.
Proport. centésim. d'amidon coagulé.	20,2 0/0	23,3 0/0	23,37 0/0

Cette expérience montre en même temps l'influence de la température et celle de la quantité de solution diastasique : à 8°, il se forme plus de coagulum qu'à 45°; à 45°, il se forme plus de coagulum avec 0 c. c. 5 de solution diastasique qu'avec une quantité double.

## EXPÉRIENCE V.

	A	B	C	D
	Températures.	Températures.	Températures.	Températures.
	33°	18°	18°	10°
Temps au bout duquel le coagulum a été étudié . . . . .	45 min.	45 min.	2 heures	45 min.
Volume de solution d'amidon. . . . .	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.
Poids de l'amidon primitif . . . . .	2 gr. 196	2 gr. 196	2 gr. 196	2 gr. 196
Volume d'extrait de malt à 10 0/0. . . .	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Proportion centésim. d'amidon coagulé	très faible	10 0/0	16,26 0/0	16,26 0/0

Cette expérience montre, en dehors de l'influence de la température qui est mise en lumière par les essais précédents, qu'on coagule la même proportion d'amidon en 45 minutes à 10° qu'en deux heures à 18°.

Après avoir indiqué les résultats obtenus, nous devons décrire rapidement la méthode par laquelle nous avons déterminé la quantité d'amidon coagulé. La pesée directe du coagulum offre de grandes incertitudes, parce qu'il est très difficile de le laver à fond. Nous avons, par suite, été conduits à l'évaluer par différence, en dosant l'amidon existant dans la solution primitive et celui qui restait dans le liquide filtré après coagulation. Dans chacun de ces cas, l'amidon a été saccharifié sous pression par l'acide sulfurique à 1 0/0, et la quantité d'amidon été déduite par le calcul de la quantité de glucose, dosée par la



méthode de Lehmann modifiée par Maquenne. Dans chaque expérience, la quantité totale de glucose obtenue a été corrigée de celle qui provenait de l'extrait de malt. On a tenu compte également du volume, toujours très faible, de soude ajoutée.

#### IV

La présence simultanée dans l'extrait de malt des propriétés coagulantes et saccharifiantes pourrait faire naître l'idée que la coagulation est une conséquence de la saccharification et n'a pas besoin, pour se produire, d'une diastase spéciale. Elle s'expliquerait alors par une modification du milieu, produite sous l'influence de l'amylase, modification qui aurait pour effet une précipitation de l'amidon. Nous avons fait une série d'expériences destinées à étudier si cette manière de voir est admissible. Certaines expériences exposées plus haut nous ont déjà appris d'ailleurs que l'extrait de malt peut très bien produire, au-dessus de 25°, une saccharification très active, sans que cette saccharification donne lieu à une coagulation; nous savons aussi que l'extrait de malt, chauffé à 63°, produit encore la saccharification, sans pouvoir produire de coagulation, même si on se place dans les conditions les plus favorables à l'apparition du phénomène. Mais on peut nous objecter que, dans les expériences que nous venons de rappeler, la proportion des produits de la saccharification, maltose et dextrine, n'est pas la même que celle qui se forme dans les cas où nous constatons une coagulation. Voici une expérience dans laquelle les proportions d'amidon, de maltose et de dextrine sont celles qui existent au moment d'une coagulation, et qui, cependant, ne donne lieu à aucune précipitation d'amidon.

Une solution à 4 0/0 d'amidon réel, solubilisé à 130° pendant 2 heures, a été coagulée comme à l'ordinaire (1 c. c. d'extrait de malt à 10 0/0 pour 50 c. c.), puis filtrée. Le liquide filtré a été porté à l'ébullition pour détruire les diastases, puis refroidi. Ce liquide a été mélangé avec son volume de la solution d'amidon primitive; le mélange contenait dès lors un peu plus de 2 0/0 d'amidon. Nous n'avons observé dans ce mélange aucune précipitation; par contre, le même mélange additionné d'extrait de malt s'est coagulé comme à l'ordinaire.

Nous avons fait, d'autre part, des mélanges de la solution d'amidon soluble avec des proportions variables du même liquide séparé du coagulum par filtration, en ramenant toujours l'amidon à la même concentration, et nous n'avons jamais observé de coagulation, en dehors de l'addition d'extrait de malt. Nous avons été conduits exactement aux mêmes résultats négatifs en mélangeant de l'amidon soluble à 40/0 avec le même amidon préalablement saccharifié par l'extrait de malt à diverses températures. Signalons en passant que le maltose seul, loin de favoriser l'action de l'amylo-coagulase, la gêne et peut même l'empêcher, si on l'emploie à dose massive, et qu'il en est de même du produit concentré de la saccharification de l'amidon par l'amylase.

## V

Quelle est la nature du produit résultant de la coagulation des solutions d'amidon par l'amylo-coagulase? Nous nous contenterons de donner des indications sommaires à ce sujet, parce que nous avons rencontré un certain nombre de faits nouveaux qu'il est préférable d'exposer ultérieurement dans leur ensemble.

Si l'on traite par l'eau bouillante, aussitôt après sa formation, le coagulum séparé du liquide dans lequel il s'est produit, ou si on le fait bouillir au sein de ce liquide, il se dissout intégralement ou ne laisse qu'un résidu insignifiant. Par le refroidissement, la solution se trouble, et le trouble se résout rapidement en un précipité floconneux plus ou moins abondant, qui ne représente jamais qu'une fraction du coagulum primitif.

Tels étaient les faits que nous avons observés<sup>1</sup>, lorsque M. Maquenne, par une note insérée aux *Comptes Rendus* (t. CXXXVII, p. 797), nous a fait connaître un côté du problème qui n'avait pas jusque-là attiré notre attention. M. Maquenne, dans le travail auquel nous venons de faire allusion, développe des faits, déjà signalés par lui antérieurement (ibid., t. CXXXVII, p. 88), relatifs au phénomène qu'il a désigné sous le nom de *rétrogradation* de l'empois de l'amidon. L'amidon *rétrogradé* de M. Maquenne (*amylo-cellulose* de Brown et Heron) prend naissance lorsqu'on abandonne à lui-même de l'empois d'amidon stérile, et se forme d'autant plus facilement que l'empois est

<sup>1</sup> C. R., t. CXXXVII, p. 748.

plus concentré et a été chauffé moins haut. Il est caractérisé par la résistance qu'il oppose à la saccharification par l'extrait de malt et par les acides minéraux; il ne se colore pas en bleu par l'iode, mais prend la propriété de se colorer lorsqu'il a été dissous dans un alcali et que la solution a été neutralisée par un acide fort, ainsi que nous l'avons signalé dans une note publiée en commun avec M. Maquenne (*C. R.*, t. CXXXVIII, p. 49). Cette propriété permet de déceler la présence de l'amylo-cellulose, et même de juger de la quantité d'amylocellulose par l'importance du dépôt bleu que ce corps fournit au bout d'un certain temps, après la coloration dont nous venons de parler.

Nous avons ainsi été amenés à constater la présence de l'amylocellulose dans le coagulum qui se forme sous l'influence de l'amylo-coagulase et à reconnaître que le précipité floconneux dont nous avons parlé tout à l'heure présente les propriétés de l'amylocellulose<sup>1</sup>. Cette amylocellulose constitue une portion très variable du coagulum; les divers états sous lesquels elle se trouve dans le coagulum, à côté d'amidon précipité présentant encore les propriétés de l'amidon soluble primitif, sont eux-mêmes sujets à de grandes variations. Nous nous contenterons de donner une idée des variations dans sa proportion en signalant des chiffres extrêmes choisis dans un très grand nombre de déterminations :

Exp. I.	Amidon coagulé total. .	49 0/0 de l'amidon primitif.		
	Non saccharifiable à 67°. .	3,39 0/0	—	—
Exp. II.	Amidon coagulé total. .	23,2 0/0	—	—
	Non saccharifiable à 65°. .	12,49 0 0	—	—

Ces différences considérables dans la composition du coagulum produit par l'amylo-coagulase sont dues à l'intervention d'un très grand nombre de facteurs, tels que température, temps, état de l'amidon mis en expérience, réaction du milieu. C'est le rôle de ces divers facteurs que nous nous proposons d'exposer dans un mémoire ultérieur.

1. Nous employons ce terme avec la signification que lui attribue M. Maquenne, et, pas plus que lui, nous ne voulons indiquer par là un corps bien défini, mais bien un ensemble complexe, pour lequel le nom d'*amylo-celluloses* nous semble-rail plus correct. Le terme *amidon* comporterait d'ailleurs une observation du même ordre.



# Etudes sur les microbes nitrificateurs

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

---

PAR MM.

E. BOULLANGER

ET

L. MASSOL

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

Attaché à l'Institut Pasteur de Lille

---

Nous avons étudié, dans un précédent mémoire<sup>1</sup>, l'influence de la concentration saline sur le travail des microbes nitrificateurs. Ces premières expériences n'ont porté que sur un seul sel ammoniacal, le sulfate d'ammoniaque, et sur les nitrites et nitrates alcalins ou alcalino-terreux. Nous avons cherché depuis à compléter ces recherches par l'étude de la formation des divers nitrites et de la nitrification des divers sels ammoniacaux par le ferment nitreux, ainsi que de l'oxydation des divers nitrites par le ferment nitrique.

*Formation de divers nitrites par le ferment nitreux.* — On peut d'abord se demander si toutes les bases carbonatées peuvent être indifféremment employées pour saturer l'acide nitreux formé par le microbe, et si les divers nitrites ainsi obtenus n'ont pas une action nocive sur la nitrification. Pour élucider cette question, nous avons remplacé dans le milieu ordinaire à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque le carbonate de magnésie par un autre carbonate, de manière à former ainsi le nitrite correspondant à la base carbonatée.

Nous avons pu ainsi constater la nitrification du sulfate d'ammoniaque en présence des carbonates de magnésium, de calcium, de baryum, de strontium, de zinc, de plomb, de nickel, de manganèse, de cuivre, de fer, de bismuth, etc. Le ferment nitreux peut donc s'accommoder parfaitement de toutes les bases carbonatées communes.

*Nitrification des divers sels ammoniacaux.* — Dans les milieux où s'exerce dans la nature l'action du ferment nitreux, l'ammoniaque peut se trouver combinée à un très grand nombre d'acides minéraux ou organiques. Il est dès lors intéressant de savoir si

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVII, 1903, p. 492.

ces divers sels ammoniacaux subissent également la fermentation nitreuse, et si les acides auxquels l'ammoniaque se trouve combinée, en particulier les acides organiques, n'exercent pas sur le microbe une influence défavorable.

Pour résoudre ce problème, nous avons essayé de faire nitrifier un certain nombre de sels d'ammoniaque. La proportion employée pour chaque sel correspondait à 0<sup>gr</sup>,257 d'ammoniaque par litre, ce qui équivalait à une dose de 1 gramme par litre de sulfate d'ammoniaque.

Dans ces conditions, nous avons obtenu une nitrification complète avec les sels d'ammoniaque suivants : arséniate, azotate, azotite, borate, bromure, carbonate, chlorure, fluorure, hyposulfite, phosphate, phosphate ammoniaco-magnésien, sulfate, sulfite, sulfure, acétate, formiate, lactate, malate, succinate, tartrate et urate. L'arsénite, l'iodure, le citrate et l'oxalate ne nitrifient qu'à une dose plus faible (0<sup>gr</sup>,5 à 1 gramme par litre).

Le chlorhydrate d'hydroxylamine n'est pas attaqué par le ferment nitreux, même aux doses faibles.

Le ferment nitreux est peu sensible à certains sels qui présentent, pour les autres microbes, des propriétés antiseptiques : par exemple, les solutions de borate et de fluorhydrate d'ammoniaque à 2 grammes par litre nitrifient très rapidement.

Des expériences complémentaires nous ont permis de voir qu'on pouvait augmenter beaucoup la proportion de la plupart des sels organiques d'ammoniaque sans gêner la nitrification. Ainsi ferment nitreux transforme entièrement le lactate, le malate et le succinate d'ammoniaque à la dose de 10 grammes par litre ; le tartrate, l'acétate, le formiate et l'urate à la dose de 6 grammes. Les nitrites formés dans ces conditions nitrifient également sans difficultés par le ferment nitrique.

Nous pouvons donc conclure que les microbes de la nitrification sont peu sensibles à la présence de certaines substances organiques, telles que les sels des acides organiques communs, et qu'il n'est pas nécessaire que ces sels soient au préalable décomposés par des microbes pour que la nitrification puisse s'implanter dans les liquides qui les contiennent.

*Nitrification de divers nitrites par le ferment nitrique.* — Il restait à voir si le ferment nitrique peut nitrifier la plupart des nitrites. Voici ce que nous avons observé sous ce rapport :

A la dose de 0<sup>gr</sup>,5 à 1 gramme par litre, le ferment nitrique oxyde à peu près tous les nitrites. Nous avons expérimenté avec les nitrites de potassium, de sodium, de calcium, de magnésium, de baryum, de zinc, de plomb, de manganèse, de cuivre, etc., et nous avons observé partout une nitrification complète. Donc, dans la pratique, la base à laquelle est combiné l'acide nitreux n'a que peu d'importance; cependant, l'oxydation paraît se faire plus aisément avec les nitrites alcalins ou alcalino-terreux, surtout à forte dose.

\* \*

Pour étudier de plus près l'oxydation des sels ammoniacaux et des nitrites par les microbes nitrificateurs, nous avons suivi la marche du phénomène en faisant chaque jour des prises d'échantillons avec des pipettes flambées et en dosant le nitrite ou le nitrate formé. Voici quelques expériences de cette nature.

1<sup>o</sup> *Fermentation nitreuse*. — 1,000 c. c. de milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Base carbonatée : carbonate de chaux. Ensemencement le 12/IX avec le ferment Java. Le tableau suivant indique la marche de l'oxydation.

DATES	RÉACTIONS		NITRITE formé en gr. de $\text{AzO}_2\text{Na}$ par litre.	AUGMENTATION de nitrite par litre et par jour en gr. de $\text{AzO}_2\text{Na}$ .
	Ne	Tr		
12/IX	+	o		»
13 »	+	f	traces	»
17 »	+	f	—	»
19 »	+	+	0,224	»
21 »	+	+	0,428	0,102
23 »	+	+	0,582	0,077
25 »	+	+	0,745	0,081
28 »	+	+	1,007	0,087
30 »	+	+	1,194	0,093
3/X	s	+	1,445	0,084
5 »	f	+	1,582	0,070
7 »	o	+	1,714	»

(Ne, réaction au Nessler; Tr, réaction au Trommsdorff; o, nulle; f, faible; s, sensible; + intense.)



Nous voyons qu'il y a d'abord une période d'incubation de 6 jours pendant laquelle le ferment semble ne pas travailler. Puis apparaissent brusquement les nitrites, et l'oxydation se poursuit d'une façon à peu près régulière, sans augmenter ni diminuer d'intensité, jusqu'à la disparition complète de l'ammoniaque. Dans cette expérience, la vitesse de nitrification de l'ammoniaque est d'environ 90 milligrammes de nitrite formé par litre et par jour. La transformation de l'ammoniaque est si complète que le réactif de Nessler, pourtant très sensible, n'indique plus trace d'ammoniaque dans le liquide.

L'activité de l'oxydation de l'ammoniaque par notre ferment nitreux correspond à peu près à celle que signale M. Winogradsky dans son cinquième mémoire sur la nitrification<sup>1</sup>, c'est-à-dire 20 milligrammes d'azote ammoniacal oxydé par jour.

2° *Fermentation nitrrique.* — 4,000 c. c. de milieu minéral à 1 gramme par litre de nitrite de soude. Ensemencement le 5/9 avec le ferment Bruyère. On a pris chaque jour la réaction au Trommsdorff, puis la réaction à la diphénylamine après destruction des nitrites, et on a dosé le nitrate formé. Le tableau suivant résume la marche de l'oxydation :

DATES	RÉACTIONS		NITRATE formé en gr. de $\text{AzO}_3\text{Na}$ par litre.	AUGMENTATION de nitrate par jour et par litre en gr. de $\text{AzO}_3\text{Na}$ .
	Tr	Di		
5/IX	+	f	traces	»
7 »	+	+	0,200	»
9 »	+	+	0,334	0,067
11 »	+	+	0,466	0,066
14 »	+	+	0,734	0,090
16 »	f	+	1,085	0,175
17 »	o	+	1,157	»

Nous voyons qu'ici la période d'incubation est beaucoup plus courte. Le nitrate apparaît après 48 heures, l'oxydation est d'abord assez lente pendant les 5 ou 6 premiers jours, et la

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, p. 609.

quantité de nitrate formé est d'environ 70 milligrammes d'azotate de soude par litre et par jour. Mais bientôt le phénomène s'accélère : dans les 3 jours suivants, il s'est formé en moyenne 90 milligrammes d'azotate de soude par litre et par jour, et, dans les derniers jours, 175 milligrammes, soit presque une quantité triple de celle qui se formait au début. Comme pour le ferment nitreux, l'oxydation est ici absolument complète, et, au bout de 12 jours, le réactif iod-amylique, pourtant très sensible, ne décelait plus trace de nitrite.

La vitesse de l'oxydation est ici très supérieure à celle qui a été observée par M. Winogradsky pour le ferment nitrique<sup>1</sup>. Ce savant n'a obtenu, avec un ferment d'une énergie exceptionnelle et au bout de 6 semaines de culture, que 10 milligrammes d'azote nitreux oxydé par jour. Nous voyons qu'en 12 jours, y compris la période d'incubation, notre ferment nitrique a oxydé environ 200 milligrammes d'azote nitreux, soit en moyenne 17 milligrammes par jour, et que cette quantité a atteint à un moment donné 30 milligrammes.

Ce ferment paraît donc beaucoup plus actif que celui de M. Winogradsky, et sa puissance est certainement supérieure à celle de notre ferment nitreux. Nous en trouverons d'autres preuves bientôt.

3° *Fermentations des deux microbes nitrificateurs en symbiose.* — Il semble difficile à première vue de réaliser au laboratoire la culture symbiotique véritable des deux organismes, c'est-à-dire la transformation *simultanée* du sel ammoniacal en nitrite par le ferment nitreux et du nitrite en nitrate par le ferment nitrique. En effet, la plupart des expérimentateurs qui se sont occupés de la nitrification ont constaté que l'ammoniaque passe d'abord à l'état de nitrite, et que l'oxydation du nitrite ne commence que quand la phase nitreuse est terminée. Il y a donc action successive des deux microbes et non pas symbiose.

M. Winogradsky avait donné, en 1891, une première explication de ce fait. D'après ce savant, le ferment nitreux, beaucoup plus actif que le ferment nitrique, étouffe au début la végétation de ce dernier microbe, qui ne peut se multiplier que quand la fermentation nitreuse est terminée.

Dans le milieu terre, la symbiose qu'on observe toujours

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 610.

était due, d'après M. Winogradsky, à la porosité du milieu <sup>1</sup>.

Au contraire, M. Warington <sup>2</sup> expliquait le phénomène par une action paralysante de l'ammoniaque sur le ferment nitrique.

Les résultats que nous avons signalés plus haut au sujet de l'activité des deux ferments font considérer la première hypothèse comme très peu probable. D'ailleurs, MM. Winogradsky et Oméliansky ont reconnu depuis que l'hypothèse de M. Warington est parfaitement exacte et ils ont démontré d'une façon précise que l'ammoniaque exerce sur le ferment nitrique une action déprimante très énergique <sup>3</sup>. La dose de 5 milligrammes d'ammoniaque par litre sous forme de sulfate d'ammoniaque retarde nettement la marche du ferment, la dose de 150 milligrammes par litre l'arrête complètement.

MM. Winogradsky et Oméliansky se sont basés sur cette sensibilité du ferment nitrique à l'ammoniaque pour expliquer les phénomènes qui se passent dans la nitrification dans la nature. D'après ces auteurs, les germes du ferment nitrique, paralysés par les plus petites traces d'ammoniaque, restent à l'état de repos jusqu'à disparition complète de ce corps, et leur action ne commence à se manifester, après incubation plus ou moins longue, que lorsque la fermentation nitreuse est complètement terminée.

Cette manière de voir est parfaitement conforme aux faits quand on examine les expériences de symbiose entreprises au laboratoire. Nous allons voir en effet que, dans la plupart des cas, la fermentation nitreuse s'établit d'abord et la fermentation nitrique n'apparaît que quand la première est à peu près terminée. Mais dans la pratique, cette opinion est directement contredite par les faits. On voit couramment la symbiose se produire dans les lits bactériens d'épuration des eaux résiduaires, en présence de doses d'ammoniaque parfois très élevées. Il se forme simultanément de faibles quantités de nitrites et de fortes quantités de nitrates et les eaux après épuration contiennent encore de l'ammoniaque non oxydée. Les deux phénomènes sont donc superposés et non pas successifs. Citons comme exemple la nitrification des eaux des abattoirs de Lille, contenant jusqu'à 210 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline par litre, qui s'est

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 612.

2. *Proceedings of the chem. Soc.*, n° 98, 1891.

3. *Archives des Sciences Biologiques de Saint-Petersbourg*, t. VII, p. 233.



effectuée sans difficultés, la majeure partie de l'ammoniaque passant à l'état de nitrates avec une formation intermédiaire de nitrites presque insensible<sup>1</sup>. Cette dose d'ammoniaque est supérieure à celle qui arrête complètement la marche du ferment nitrique. On sait en outre, par les expériences de M. Schloësing<sup>2</sup>, que des doses considérables d'ammoniaque n'empêchent nullement l'action du ferment nitrique dans la terre. Ces faits nous conduisent à penser qu'il doit exister un mécanisme qui permet dans certaines conditions la marche symbiotique des deux organismes.

Dans le but d'élucider cette question, nous avons fait plusieurs essais de culture des deux microbes nitrificateurs associés. Nous en rapporterons ici deux seulement.

*Première expérience.* — 1,000 c. c. de milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Base carbonatée : carbonate de chaux. Ensemencement simultané du ferment nitreux Java et du ferment nitrique Bruyère le 12/9. On a fait chaque jour une prise d'échantillon, noté les réactions au Nessler, au Trommsdorff et à la diphénylamine (après destruction des nitrites), et on a dosé le nitrite et le nitrate produits. Le tableau suivant résume la marche de la fermentation :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE formé en gr. de $\text{AzO}_2\text{Na}$ par litre.	NITRATE formé en gr. de $\text{AzO}_3\text{Na}$ par litre.
	Ne	Tr	Di		
12/IX	+	f	f	»	»
18 »	+	+	f	0,175	0,138
21 »	+	+	f	0,341	0,136
28 »	+	+	f	0,820	0,139
30 »	+	+	f	0,945	0,137
5/X	+	+	f	1,306	0,222
8 »	+	+	f	1,512	0,217
10 »	o	+	+	1,301	0,621
12 »	»	+	+	»	1,345
14 »	»	o	+	0	2,211

1. Dr A. CALMETTE, Les Procédés Biologiques d'épuration des eaux résiduaires, *Revue d'Hygiène*, tome XXIII, mars 1901.

2. C. R. de l'Académie des Sciences, t. CIX.

Les conclusions à tirer sont nettes : il n'y a pas eu symbiose, mais action successive des deux organismes. Le ferment nitreux a d'abord transformé tout le sulfate d'ammoniaque en nitrite, et ce n'est que quand cette transformation a été complète que le nitrique a attaqué le nitrite. Il semble bien y avoir eu une tentative de multiplication du ferment nitrique vers le 5/10. un peu avant la fin de la fermentation nitreuse, mais l'augmentation en nitrates est restée faible tant que le réactif de Nessler a indiqué de l'ammoniaque. Remarquons aussi la puissance extraordinaire d'oxydation de notre ferment nitrique dans cette expérience : en six jours, tout le nitrite est passé à l'état de nitrate, soit en moyenne 50 milligrammes d'azote nitreux oxydé par jour.

*Deuxième expérience.* — Nous avons alors voulu nous rendre compte si, en cultivant les deux ferments dans un grand ballon en présence de scories, on ne peut pas favoriser la symbiose. On imite ainsi ce qui se passe dans la pratique de l'épuration des eaux résiduaires par les procédés biologiques. 4,200 c. c. de liquide minéral à 1<sup>gr</sup>,8 de sulfate d'ammoniaque par litre ont été placés dans un grand ballon à fond plat, contenant des scories jusqu'à 2 centimètres au-dessus du niveau du liquide. Ensemencement simultané des deux ferments le 12/9. Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE produit en gr. de AzO <sup>2</sup> Na par litre.	NITRATE produit en gr. de AzO <sup>3</sup> Na par litre.
	Ne	Tr	Di		
12/IX	+	f	f	»	»
17 »	+	+	f	0,222	0,125
19 »	+	+	f	»	0,127
21 »	+	+	f	1,06±	0,123
22 »	+	+	f	»	0,171
23 »	f	+	+	1,298	0,230
24 »	o	+	+	»	0,428
25 »	»	+	+	»	0,779
26 »	»	+	+	»	1,343
27 »	»	f	+	»	1,802
28 »	»	o	+	0	1,884

Nous voyons ici que la symbiose s'est effectuée pendant un temps très court, quand le taux d'ammoniaque est devenu faible. Mais l'augmentation de nitrates n'a été rapide qu'à la fin de la fermentation nitreuse. Le résultat est en somme à peu près identique à celui de l'expérience précédente : fermentation nitreuse d'abord, puis fermentation nitrique intense qui a amené en 5 jours tout le nitrite à l'état de nitrate.

La marche du phénomène a encore été identique avec un ensemencement très copieux : 100 c. c. de fermentation nitreuse et de 100 c. c. de fermentation nitrique pour un litre de liquide. Les deux fermentations ont toujours été successives.

*Symbiose des deux organismes.* — Dans ses premières études sur les microbes nitrificateurs, M. Winogradsky<sup>1</sup>, en recherchant les causes de la formation des nitrites dans les cultures en voie de nitrification, signale une observation qui, rapprochée de ce que nous savons aujourd'hui sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique, revêt un caractère particulièrement intéressant. Sur une nitrification qui a donné successivement des nitrites et des nitrates, M. Winogradsky rajoute une très faible quantité de sulfate d'ammoniaque (4 milligrammes) et renouvelle cette addition chaque fois que les nitrites ont disparu. Dans ces conditions on observe le passage direct de l'ammoniaque à l'état de nitrates, comme dans le phénomène naturel. En rajoutant des doses plus fortes de sulfate d'ammoniaque, les nitrites réapparaissent. Il était difficile alors de préciser cette observation et d'en donner une explication plausible. La seule conclusion à tirer était que la production des nitrites ou des nitrates dans la nitrification dépend non pas des qualités physiques ou chimiques du milieu, mais est d'ordre biologique.

Les notions acquises depuis sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique rendent l'observation de M. Winogradsky encore plus singulière. Nous avons donc dirigé nos recherches dans cette voie, qui nous paraissait susceptible de nous donner une explication précise des phénomènes de symbiose.

Dans le matras à scories de notre deuxième expérience, qui vient de terminer sa nitrification par le mécanisme que nous avons indiqué, enlevons aseptiquement le liquide, et rajoutons maintenant un litre de nouveau milieu minéral à 1<sup>gr</sup>,8 environ

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 587.



de sulfate d'ammoniaque par litre. Ces opérations se font aisément dans ces grands matras munis de tubulures latérales. Faisons de temps à autre des prises d'échantillons pour nous rendre compte de la marche du phénomène.

Les résultats obtenus vont être tout à fait différents. Nous allons voir apparaître la symbiose parfaite des deux organismes, symbiose qui va se continuer désormais de la façon la plus régulière. Voici en effet les résultats des dosages effectués à intervalles de 24 heures en moyenne :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE	NITRATE
	Ne	Tr	Di	formé en gr. de $\text{AzO}_2\text{Na}$ par litre,	formé en gr. de $\text{AzO}_3\text{Na}$ par litre,
7/X	+	o	+	0	0,537
10 »	+	f	+	traces	»
12 »	+	s	+	0,148	0,823
13 »	+	s	+	0,146	0,951
15 »	+	s	+	0,191	1,186
16 »	+	f	+	traces	1,426
17 »	+	o	+	0	1,732
19 »	s	o	+	0	2,236
20 »	o	o	+	0	2,324

Réactions : o, nulle; f, faible; s, sensible; +, forte.

Ce tableau nous montre que le taux des nitrites a toujours été très faible dans le liquide, et que les nitrates ont augmenté progressivement depuis le début jusqu'à la disparition complète de l'ammoniaque. Malgré la dose de 460 milligrammes d'ammoniaque par litre, les deux fermentations ont été simultanées et non successives, et il y a eu véritable symbiose des deux organismes dans un milieu riche en ammoniaque.

Cette expérience a été renouvelée d'une autre manière. Nous avons effectué d'abord une première nitrification qui a donné lieu aux deux fermentations successives; puis, sans retirer le liquide nitrifié, nous avons ajouté une nouvelle dose de 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, sous forme d'une solution stérile. La symbiose s'est produite aussitôt et s'est

poursuivie jusqu'à disparition complète de l'ammoniaque. Nous avons alors ajouté une troisième dose de 2 grammes de sulfate d'ammoniaque par litre, qui a nitrifié dans les mêmes conditions ; puis une quatrième dose pour laquelle la nitrification symbiotique s'est encore produite. Nous n'avons pas cru utile de pousser l'expérience plus loin, car elle pouvait se compliquer d'influences qui n'ont rien de commun avec le problème.

Nous avons enfin réalisé la même expérience sur une nitrification en milieu liquide, sans présence de scories. Les résultats ont été identiques : la première nitrification a donné lieu aux deux fermentations successives, la seconde à la symbiose.

Lorsqu'on place les deux microbes dans des conditions de culture exceptionnellement favorables, on peut même arriver à produire du premier coup la symbiose dans le milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Il suffit pour cela d'employer la méthode que nous avons indiquée dans notre premier mémoire, c'est-à-dire d'ensemencer très copieusement (100 c. c. pour 1 litre), les deux ferments dans de petits tonneaux roulants en verre remplis de scories, stérilisés et parcourus par un courant d'air stérile. La nitrification s'effectue alors complètement en symbiose avec une formation intermédiaire de nitrites presque insensible.

Les résultats sont encore plus nets avec la culture pure des deux organismes dans un long tube de verre vertical, de 6 centimètres de diamètre, composé de trois morceaux de 80 centimètres superposés, stérilisables séparément et remplis de scories. Cet appareil correspond en somme parfaitement à l'appareil vertical allemand pour la fabrication du vinaigre. Il recevait à la partie supérieure goutte à goutte la solution minérale à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, fortementensemencée par les deux ferments : le liquide recueilli à la partie inférieure était remonté, par une petite pompe à air stérilisé, dans le réservoir du haut. Tout l'appareil, dans lequel les microbes nitrificateurs étaient maintenus à l'état pur, était parcouru par un très lent courant d'air filtré sur coton, et chaque tube portait une tubulure de prise d'échantillon. Dans ce « nitrificateur vertical », le phénomène a été d'une intensité extrême. Les trois tubes ont donné indistinctement du premier coup peu ou pas de nitrites et beaucoup de nitrates, jusqu'à disparition

de l'ammoniaque. La symbiose était donc complète partout.

Mais ce sont là des conditions exceptionnelles, et dans les procédés de culture ordinaires du laboratoire, le phénomène se passe toujours comme nous l'avons indiqué plus haut : les deux fermentations sont d'abord successives, et ne deviennent simultanées qu'après une première nitrification qui a permis le développement des deux organismes.

Ces diverses observations nous conduisent à la nécessité d'une étude plus précise de l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique. Les résultats qui précèdent semblent indiquer que si l'ammoniaque agit très énergiquement sur le ferment nitrique « végétal » et gêne beaucoup sa multiplication, elle paraît très peu active sur la fonction oxydante du microbe développé. Ainsi s'expliqueraient les résultats opposés de la nitrification au laboratoire et dans la nature. Au laboratoire, onensemence le microbe, généralement en petite quantité, dans le milieu ammoniacal, et la multiplication du ferment nitrique se fait mal : d'où pas de symbiose. Dans la nature, au contraire, nous sommes ordinairement en présence de supports peuplés, comme le sol et les lits bactériens d'épuration, supports en voie de nitrification continue : c'est le cas de notre dernière expérience, dans lequel la symbiose est la règle.

*Action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique.* — Pour fortifier l'hypothèse qui précède, nous pouvons dès maintenant donner les premiers résultats de nos expériences actuellement en cours sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique.

Cette action a été mise pour la première fois nettement en évidence par MM. Winogradsky et Oméliansky<sup>1</sup>. Mais ces savants se sont bornés au simple examen de la réaction nitritée, qui ne peut indiquer si la nitrification a été nulle ou partielle. Nous avons donc d'abord répété leur expérience en ensemençant le ferment nitrique dans le milieu minéral à 1 gramme par litre de nitrite de soude, en présence de doses croissantes de sulfate d'ammoniaque, et au bout de deux mois environ, nous avons dosé le nitrite restant dans les matras qui n'avaient pas terminé leur nitrification. L'ensemencement a été assez fort, 1 c. c. de culture jeune pour 25 c. c. de milieu. Voici les résultats obtenus :

1. *Archives des Sciences biologiques de Saint-Petersbourg*, tome VII, p. 233.



*Action sur le ferment de l'ammoniaque ajoutée avant l'ensemencement.*

AMMONIAQUE en gr. p. litre de liquide.	RÉACTIONS AU Tr.													DURÉE de la nitrifi- cation.	NITRITE initial en gr. de $\text{AzO}^{\text{II}}\text{Na}$ p. litre.	NITRITE restant en gr. de $\text{AzO}^{\text{II}}\text{Na}$ p. litre.
	Dates.															
	Est 20/10	27	28	29	30	4/11	5	6	14	16	2/12	6	12			
0 témoin	+	s	o											8 jours	1,081	0
0,00515	+	+	+	s	o									10 —	—	0
0,0103	+	+	+	+	+	s	o							16 —	—	0
0,0206	+	+	+	+	+	+	s	o						17 —	—	0
0,0412	+	+	+	+	+	+	+	s	f	o				27 —	—	0
0,0824	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s	f	o	53 —	—	0
0,1236	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	incomplete	—	0,507
0,1648	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,830
0,2575	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,891
0,4120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,914
0,721	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,952
1,034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,951
1,500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,937
2,040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	»

Nous arrivons donc ici aux mêmes conclusions que MM. Winogradsky et Oméliansky. Depuis la dose de 5 milligrammes d'ammoniaque par litre, les durées de nitrification s'allongent de plus en plus, et, pour 82 milligr. le retard sur le témoin atteint 45 jours. Pour les doses supérieures, le réactif de Trommsdorff indiquait encore après 2 mois la présence de fortes quantités de nitrites. Si nous examinons les résultats des dosages, nous constatons que le ferment nitrique a agi partout. A la dose de 164 milligr., dose limite indiquée par MM. Winogradsky et Oméliansky, il n'y a plus qu'un cinquième environ qui a nitrifié. Aux doses d'ammoniaque supérieures, la diminution de nitrites est faible et à peu près la même partout. Il semble donc y avoir une dose, voisine de 160 à 180 milligrammes d'ammoniaque par litre, au delà de laquelle on

n'observe qu'une légère transformation due aux microbes jeunes introduits par la semence.

Plaçons-nous maintenant dans le cas de notre symbiose. Faisons d'abord nitrifier le ferment nitrique sur une dose de 2 grammes par litre de nitrite; puis, quand la nitrification est terminée, rajoutons une nouvelle dose de nitrite et en même temps des doses croissantes de sulfate d'ammoniaque sous forme de solutions stériles. Voici ce que nous observerons :

*Action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique en voie de nitrification. — Addition du nitrite le 26 novembre.*

AMMONIAQUE en gr. par litre de liquide.	RÉACTIONS AU Tr.								NITRITE ajouté en gr. de AzO <sup>2</sup> Na par litre.	NITRITE restant en gr. de AzO <sup>2</sup> Na p. litre.
	Dates.									
	26/11	27	28	29	30	1/12	5	12		
0 témoin	+	+	s	o					1,080	0
0 —	+	+	s	o					—	0
0 —	+	+	+	s	o				—	0
0,0046	+	+	s	o					—	0
0,0092	+	+	s	o					—	0
0,0184	+	+	s	f	o				—	0
0,0368	+	+	s	f	o				—	0
0,0736	+	+	s	f	o				—	0
0,1104	+	+	s	f	o				—	0
0,1472	+	+	+	s	f	f	f	f	—	traces
0,2298	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,3680	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,6437	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,9200	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
1,3794	+	+	+	+	+	s	s	s	—	0,150
1,8400	+	+	+	+	+	s	s	s	—	0,180

Réactions : o, nulle; f, faible; s, sensible; +, intense.

Quand on ajoute du sulfate d'ammoniaque sur un ferment nitrique en voie de nitrification, on observe donc les phénomènes suivants :

1° Il n'y a pas de retard dans la nitrification jusqu'aux doses de 110 milligrammes d'ammoniaque par litre;

2° Jusqu'aux doses de 2 grammes par litre, le retard est peu accusé et atteint à peine 48 heures, mais l'oxydation du nitrite n'est pas absolument intégrale, et il reste au Trommsdorff une petite réaction bleutée qui ne disparaît que très lentement. Les quantités de nitrite restant ne sont pourtant dosables que pour les proportions de 1<sup>er</sup>, 37 à 1<sup>er</sup>, 84 d'ammoniaque par litre, où elles atteignent environ 150 à 180 milligrammes de nitrite par litre, sur 1,080 introduits.

Ces résultats concordent parfaitement avec ceux que nous avons obtenus dans la culture des deux organismes en symbiose et donnent l'explication du phénomène. L'ammoniaque agit sur le ferment nitrique surtout en gênant sa multiplication, et il faut atteindre des doses très fortes d'ammoniaque pour retarder légèrement la fonction oxydante du microbe.

Cherchons maintenant à appliquer ces notions à la nitrification dans la nature. Les milieux qui nitrifient contiennent en général une quantité d'ammoniaque inférieure à la dose qui arrête tout développement du ferment nitrique. Cette dose, qui est de 200 milligrammes par litre environ, n'est atteinte et dépassée que dans quelques eaux résiduaires très impures, comme les eaux d'abattoirs. Dans les terres, qui sont en voie de nitrification incessante, il y a généralement peu d'ammoniaque. Le ferment nitrique se multiplie donc dès le début, plus ou moins vite suivant la quantité d'ammoniaque présente. Ces notions sont bien d'accord avec les observations des auteurs qui se sont occupés de l'épuration des eaux résiduaires, et qui ont constaté que dans la mise en marche des lits bactériens, la proportion de nitrites est en général plus grande au début que par la suite. Quand le support est peuplé, c'est-à-dire quand les deux microbes sont développés, la symbiose s'effectue alors d'une façon absolue. Si même les conditions viennent à changer et si le taux d'ammoniaque s'élève, nous avons vu que le ferment nitrique qui s'est développé en oxydant une dose donnée de nitrite est toujours capable de transformer en présence d'ammoniaque une dose de nitrite *au moins égale* à la première. La symbiose ne cessera donc pas de s'exercer; le ferment nitreux abaisse de plus en plus le taux d'ammoniaque et bientôt la



multiplication du ferment nitrique recommence. Comme la dose de 200 milligrammes d'ammoniaque par litre, qui arrête toute multiplication du ferment nitrique, n'est que très rarement dépassée dans la pratique, on comprend sans peine que les phénomènes de nitrification ne se présentent à nous dans la nature que sous la forme symbiotique qui résulte de l'action simultanée des deux organismes.

Ceci ne veut pas dire que la question soit complètement tranchée, et il reste maintenant à étudier le mécanisme même de l'action du ferment nitrique sur le nitrite en présence de fortes doses d'ammoniaque, car ce mécanisme seul permettra de tirer tout à fait au clair la question de la vie symbiotique des deux microbes. Cette étude est aujourd'hui assez avancée, et nous espérons pouvoir l'aborder prochainement ici.

---

# ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

(Suite. Voir p. 121.)

Par M. E. DUCLAUX

## X

### TERRAINS PRIMITIFS

Des terrains de gneiss, laissés en blanc sur la carte, (v. p. 122) une partie nous apparaît telle qu'elle était lorsqu'elle formait les rivages de la mer calcaire miocène que nous avons décrite. C'est surtout au sud d'Aurillac, où ils dominent encore la vallée de la Cère. Ils ont vu le lac se dessécher, le volcan naître et mourir, se creuser les 3 vallées de la Cère, de la Jordanne et de l'Authre, sous l'influence des pluies et des glaciers, et celui de nos aïeux qui habitait les plateaux de Prunet, de la Roumigièrre, de Labrousse, a pu voir de curieux spectacles.

Les pentes du volcan étaient à peine consolidées que leur érosion commençait. Les premières portions enlevées étaient celles de la surface, et nous avons vu les îlots volcaniques qui sont les derniers témoins de l'effrangement et de la dislocation des couches de basalte et de phonolite étalés sur les couches calcaires.

Plus loin, à partir du centre, nous voyons de même des îlots de calcaire, en général éocènes, qui apparaissent sur le terrain primitif, réserves, pour l'érosion de demain, de celle d'aujourd'hui. Puis vient le terrain primitif, sur lequel tout revêtement calcaire a disparu, et où, les étages de calcaire et de terrain volcanique ayant été arrasés, il n'y a plus que l'étage du rez-de-chaussée avec celui des caves.

Dans l'étude de ce terrain, je n'ai pas fait de distinction entre les gneiss, les micaschistes, les granulites ou les granites, car, à notre point de vue, tous sont identiques. J'ai aussi négligé, parce qu'elle est sans importance, la mince bande de terrain houiller qui traverse le Cantal, et qui est surtout visible près du confluent de la Cère et de l'Authre.

Dans ce sol, qui s'abaissait peu à peu, les rivières s'occupaient à creuser leur lit, et elles y avaient de la peine.

Tant qu'elles coulent dans le terrain volcanique, ce sont des torrents. Le fond de leur lit est occupé par des débris, parfois très volumineux, provenant de l'éboulement des hauteurs. Le travail des eaux, bien moins puissant qu'autrefois, s'emploie aujourd'hui à dégrader ces débris et à en faire du sable, à user, par suite, le fond du lit.

Quand cette érosion, qui creuse le fond, est venue rencontrer les couches calcaires, celle de la Cère à Vic, de la Jordanne à Velzig, de l'Authre à Marmanhac ou à La Roquevieille, la vallée s'élargit. Le fond devient moins dur, plus facile à dissoudre et à briser. Le cours se régularise. C'est la rivière tranquille, glaciaire, qui dure sur toute la traversée du terrain tertiaire, jusqu'à ce qu'elle ait rencontré des gneiss et des granulites en masse ou en filons. C'est là que se dresse devant elle l'obstacle dont elle doit triompher pour sortir de ce fond de cuvette dont j'ai parlé en débutant, et pour quitter le département.

De Sansac pour la Cère et la Jordanne, d'Ytrac pour la rivière d'Authre, on voit bien, même sur la carte routière, que le sol a changé. La vallée s'est resserrée. La vallée n'est plus qu'un ravin. C'est le régime du début qui recommence, et quand les trois rivières se sont réunies à La Capelle-Viescamp, la Cère n'a plus qu'un cours tourmenté, que le chemin de fer côtoie, jusqu'au moment où elle rencontre la grande vallée, où elle oublie ses origines volcaniques.

On retrouverait des faits analogues pour les autres rivières du Cantal, en faisant attention que, pour elles, les deux premières parties du cours se confondent presque en une, la rivière passant directement du terrain volcanique sur le terrain primaire.

La Bertrande n'a qu'un seul point de transition, visible par le faible lambeau de calcaire qu'on trouve au sud, et près de Saint-Chamand. La Maronne a un palier calcaire en face de Salers, et l'Auze s'élargit en face de Salins à peu près comme la Cère au Pas-de-Cère. Il y a donc, sous les différences apparentes, une ressemblance profonde dans le régime de toutes ces eaux.

A toutes ces ressemblances générales, nous savons maintenant ajouter une différence qui est de détail, mais qui n'a pas moins une grande importance. C'est que le micaschiste du Cantal est en moyenne plus absorbant que le terrain volcanique, et

même que le terrain tertiaire. Le gneiss absorbe d'ordinaire tout ce qui lui arrive d'eau de pluie, soit par sa porosité naturelle, soit que le manteau de végétation, que cette porosité favorise en maintenant de l'humidité dans les couches superficielles, produise l'effet de tous les couverts. Il y a peu ou pas de ruissellement : le sol est moutonné, et, dans les vallées ou ravins, les pentes ne s'éboulent pas, c'est pour cela que le fond du ravin qui est toujours nu se creuse toujours. On retrouve partout la même tendance, et la Truyère coule dans un ravin qui se creuse comme les gorges de la Cère.

Tout ce que nous venons de voir nous renseigne sur l'hydrographie souterraine de la région. Il est clair qu'on ne peut s'attendre ici à aucun grand mouvement des eaux, et que le régime sera celui des petites sources ou des puits, comme dans la partie calcaire. Seulement, la ressemblance des mots cache une profonde différence des choses.

Ici, le sol n'est pas formé de couches superposées, inégalement perméables ou même tout à fait imperméables. En principe, il reste perméable, et il s'y forme à chaque pluie un approvisionnement d'eaux qui pénètre plus ou moins profondément, et se met à couler de suite sur les lignes de plus grande pente, ou plutôt sur les lignes de plus facile pénétration, qui se modèlent plus ou moins sur les premières. C'est une éponge qui s'égoutte,

La comparaison avec une éponge s'impose d'autant plus que les grandes masses de micaschiste et de gneiss sont parcourues dans tous les sens par des lignes de feuilletage, qui les divisent en fragments très inégalement perméables et pénétrables par l'eau.

Les grandes masses aqueuses qu'elles conservent et limitent sont presque sans relation entre elles : il n'y a pas de niveau piézométrique, au sens défectueux qu'on donne aujourd'hui à cette expression. Bien qu'il y ait partout de l'eau, la pression est différente quand la distance de la surface est la même.

Il résulte de cette pénétration inégale de l'eau par tous les points de la surface deux choses : 1° on trouvera de l'eau en creusant où l'on voudra, et cette eau, qui n'aura pas cessé de faire partie de la masse, aura pourtant son niveau et sa pente particulière, le long de laquelle elle coulera régulièrement : voilà pour les puits, 2° il suffira d'une petite dénivellation, ou de la



moindre tranchée, pour faire naître une petite source qui aura aussi naturellement ses voies d'évacuation. 3° Les puits comme les sources ne voudront rien connaître des prétendues lois piézométriques.

## XI

### EAUX DU TERRAIN PRIMITIF

La réalité est tout à fait d'accord avec ces prémisses. Les puits sont presque aussi nombreux qu'on le veut. A toutes les altitudes, au sommet d'une colline comme sur les pentes d'un vallon, il suffit de creuser le sol à quelques mètres pour trouver, plus ou moins haut, un niveau d'eau qui, parfois est indépendant, et parfois se forme à l'aide des puits voisins. Comme on a d'ordinaire choisi un sol de schiste pourri, qui est fendu et se délite, on se met à l'aise pour creuser. Il n'est pas rare de voir des puits de 2 mètres de large. Comme ces puits sont d'ordinaire communs, on ne les respecte pas et ils sont exposés à toutes les pollutions. Si les habitations ainsi desservies ne sont pas voisines, le mal n'est pas encore trop grand. Il faut seulement éviter le voisinage immédiat des fosses d'aisances ou des fumiers. Mais si les maisons sont condensées en village, le mal grossit en se répercutant. Je n'en sais pas de meilleur exemple que celui que j'ai trouvé dans la petite ville de Montsalvy (Cantal).

C'est un gros bourg de commerce et de transit, assis sur un petit mamelon porté par un contrefort qui court du Nord au Sud, en s'abaissant vers les vallées de la Truyère et du Lot.

Quand il s'est agi de trouver de l'eau pour ce village qui grossissait, on a imité ce qui avait été fait pour les premières maisons bâties. On a fait des puits à l'extérieur de la maison, dans le jardin; on en a fait dans des caves quand les maisons se serraient et qu'il n'y avait pas de place ailleurs, parce que cela diminuait les frais, de sorte que les habitants avaient tranquillement pris l'habitude d'envoyer leurs déjections et leurs eaux-vannes dans le même sous-sol qui leur donnait de l'eau de boisson.

A ce défaut de propreté intérieure venait s'ajouter un défaut de propreté extérieure. Quand le temps est mauvais, le sol, poreux, s'humecte à fond et devient boueux et visqueux. Pour rendre la circulation plus facile, on répand sur le sol des lits de

bruyère et de fougère, que le piétinement décompose sur place, et qui, dans toutes les rues (les routes sont protégées par les



règlements), forment une couche de fumier absorbant, de sorte que la ville semble avoir pris à tâche de conserver et de laisser

à portée de ses habitants tout ce dont ceux-ci ont intérêt à se débarrasser.

Les plaintes provoquées par un pareil état des choses doivent dater de longtemps, car la ville s'est donné de l'eau prise au puy de l'Arbre, à une distance d'environ 1.000 mètres. Ce puy, dont l'altitude est de 814 mètres, domine tout le pays à plusieurs kilomètres à la ronde. Sur un autre terrain, on n'aurait guère trouvé d'eau, car le puy n'est pas étendu, mais avec le gneiss, comme j'ai dit plus haut, il y a toujours de la ressource. Une petite source, la fontaine d'Argent, réunie au produit de plusieurs drainages, fournit, au moyen d'un travail, terminé seulement en 1894, un volume d'eau qui s'élève à 40 m. c. par jour pendant les mois d'hiver, mais qui retombe à 2 ou 3 m. c. en été.

Le puy de l'Arbre est stérile et désert, heureusement, car, grâce à cela, on peut dire qu'un peu d'eau vierge entre journellement en ville, mais la population ne semble pas en avoir pris encore l'habitude, et la fontaine publique n'est guère fréquentée.

Ce sont les puits qui fournissent à l'usage; le puits de l'Arque, en particulier qui ne tarit point et qui semble être un égouttage du puy de l'Arbre. Lorsque j'ai visité Montsalvy, c'était au moment d'une petite épidémie de fièvre typhoïde, qu'on accusait ce puits d'avoir amenée. Cela est possible.

Le jardin, dans le mur duquel est creusé le puits, contient, à une distance de quelques mètres, un tas de fumier sur lequel est établie une fosse d'aisance rudimentaire, qui n'est heureusement pas publique, mais l'eau du puits est à la portée de tous.

Il est donc possible que la contagion se soit faite par ce point : mais je dois dire qu'en visitant la ville, j'ai trouvé, sur une surface d'environ 2 hectares, 22 puits dont chacun pouvait être accusé au même titre que tous les autres. (Voir la carte.)

J'ai donc jugé utile de faire à ce moment un relevé de situation, en comparant la composition de l'eau des puits de Montsalvy à ceux des régions avoisinantes.

Je suis allé 2 fois, à 15 jours d'intervalle, en octobre 1897, prélever les eaux sur tout mon parcours, en insistant, bien entendu, de préférence sur celles de la petite ville, que j'ai recueillies à leur entrée, dans les puits, dans les maisons et jardins, et en suivant aussi bien que j'ai pu le faire le trajet de

la nappe des puits à la sortie de la ville, au moment où elle enfle le ravin encaissé qui la conduit à la Truyère, du côté de la route d'Entraygues. Je suis ensuite allé visiter quelques localités des environs, dans le même horizon géologique.

L'été de 1897 avait été très pluvieux.

Là où il y a eu 2 échantillons prélevés, le premier l'a été après 8 jours de beau temps, le second après une période de 15 ou 20 jours de pluies. Il y a au moins, par provenance, une analyse complète, je veux dire réduite aux mêmes termes que dans tout ce travail, dont les éléments sont ici tous utiles. Voici les chiffres des analyses.

Le n° I est celui de la première tournée, fin septembre 1897 ; le n° II celui de la seconde, le 20 octobre de la même année.

## EAUX DE MONTSALVY

Nos d'ordre	Origine	Tempre	Résidu	Chaux	Sel marin
268	Source sur la route	10,4	26	4	5,0
269	Fontaine d'argent	10,6	35	2,0	5,0
270	Source Viguiér	11,2	36	1,5	6,0
271	Pré Bastid	?	35	1,5	5,8
272	Source Picou	?	42	4,0	10,0
273	Fontaine publiqu. I.	?	35	2,5	6,6
274	— II.	9,8	22	1,5	8,3
275	Puits de M. D. I.	10,6	563	54	221
276	— II.	10,5	575	31	205
277	Puits de M. M. I.	11,6	188	33	25
278	— II.	?	233	»	»
279	Puits de M. V. M.	10,5	323	35	97
280	Puits du Couvent I.	12,0	256	38	39
281	— II.	?	267	30	45
282	Puits public I.	12,6	534	30	179
283	— II.	?	601	28	195
284	Puits du Cloître I.	10,6	423	107	80
285	— II.	?	425	»	»
286	Puits de M. Fl. I.	10,6	676	74	213
287	— II.	10,4	690	59	220
288	Puits de M. C.	11,0	449	40	176
289	Font. del'Arque 101.	11,2	348	28	91
290	— II.	?	364	28	90
291	Puits de M. M. I.	9,8	135	17	40
292	— II.	9,3	137	14	36



293	Puits de M. C.	I.	9,8	218	29	72
294	—	II.	8,3	222	»	»
295	Puits de M. R.	I.	9,8	335	48	83
296	—	II.	9,8	328	»	»
297	Puits de M. R.-B.	I.	12,3	308	20	108,0
298	—	II.	10,8	301	»	»
299	Puits des Frères.		9,2	103	14	21,0

*Observations.* — 268 à 270, sources du Puy-de-l'Arbre. — 271 et 272, source en entrant à Montsalvy. — 273 et 274, eaux de la ville. — 275 et 276, puits fermé, mais alimentant une pompe dans la cuisine. — 277 et 278, eau un peu blanchâtre : prof. 5 mètres. — 279, prof. 2<sup>m</sup>,60, de l'autre côté de la route. — 280 et 281, pompe placée dans la cuisine. — 282 et 283, ancien puits privé, rendu public par M. D... filaments gélatineux : eau à 1<sup>m</sup>,50. — 284 et 285, puits ouverts : prof. 5<sup>m</sup>,50. Matières flottantes et abondantes que je filtre. — 286 et 287, eau laiteuse : prof. 4<sup>m</sup>,50. — 288, près l'école : quelques flocons en suspension. — 289 et 290, au fond d'une niche creusée dans le mur d'un jardin. Dans ce jardin, à 10 mètres environ du puits, un fumier avec latrines. Autour du puits, étables ou écuries avec purin ; en ce moment, l'épidémie a fait abandonner le puits. — 291 et 292, eau louche ; puits couvert : prof. 9<sup>m</sup>,40. — 293 et 294, eau un peu louche ; — 295 et 296, voisins du 289 et 296, sur l'autre versant du précédent : à 20 mètres environ de la fosse d'aisances. — 297 à 299, ces 2 puits sont dans 2 jardins voisins. Le premier à 0<sup>m</sup>,80 au-dessous du sol, le second à 4<sup>m</sup>,70 au-dessous d'un sol plus élevé, ce qui leur fait des différents niveaux. Les eaux sont très différentes.

De ces nombres, on peut tirer tout de suite quelques conclusions rien qu'en les rapprochant, en tenant seulement compte des variations qu'ils subissent et non des matériaux qu'ils représentent.

La densité des puits sur un étroit espace comme celui de la carte témoigne d'abord de l'existence d'un vaste réservoir d'eau souterraine. Je ne voudrais pas dire d'une puissante nappe d'eaux souterraines, car il n'y a pas qu'une nappe : chaque puits a la sienne à un niveau différent de l'autre, quelquefois même à des niveaux très différents à petite distance.

Il n'y a pas deux eaux qui se ressemblent dans tous ces puits, et le même puits ne fournit pas la même eau à 15 jours de distance. La température est variable aussi, le même jour et d'un jour à l'autre.

Bref, l'industrie des habitants aurait visé à se faire, aux

dépens de l'eau de pluie, toujours très pure, de l'eau de puits, toujours très impure, qu'elle y aurait très bien réussi.

Si nous abordons maintenant ce point, nous pouvons comparer la composition moyenne des eaux de Montsalvy avec celles des eaux de la même région, prises aux environs de Montsalvy. Voici quelques-unes des analyses faites : s. et p. sont les sources et les puits.

## EAUX DES ENVIRONS DE MONTSALVY

Nos d'ordre	Origine	Tempre	Résidu	Chaux.	Sel marin
300	Abiouradou, s.	11,0	174	17	45,0
301	La Grangeotte, s.	10,8	41	3	5,0
302	Labesserette, p.	?	128	13	15,0
303	— s.	12,2	67	4	6,0
304	Boussaroque, s.	11,0	39	2	6,0
305	— s.	9,4	55	2	6,0
306	La Morinie, s.	10,6	67	6	8,0
307	Junhac, s.	11,0	42	2	6,0
308	Sansac-Veinazès, s.	12,0	60	2	6,0
309	Le Bouissou, s.	11,2	57	2	8,0
310	La Feuillade, p. I.	9,8	26	3	7,0
311	— II.	?	24	3	4,0
312	La Roumyguière	11,	64	3	5,0
313	Peyrebrune, s.	11,0	22	1	2,0

*Observations.* — 300 et 301, haut du ravin qui va de Montsalvy au Lot. — 302, puits Vaissière. — 303, source du village. — 304, source en face de l'étang. — 305, source de la ferme. — 306, captage de M. Nugou. — 307 et 308, sources du village. — 309, source au bord de la route. — 310, 311, puits de chez le maréchal-ferrant. — 312, source du ravin. — 313, source de l'enclos.

L'étude de ce tableau, comparé avec le tableau précédent, conduit aux conclusions suivantes :

1<sup>o</sup> La preuve de la contamination des eaux de Montsalvy est faite par l'apparition, dans l'eau des puits, de 2 éléments, presque absents dans les eaux vierges de la même région géologique : la chaux et le chlore. La chaux, qui fait ici surtout défaut et qui est presque aussi absente que sur les hauts sommets du terrain volcanique, est apportée par les aliments de l'homme et des animaux ; c'est de l'intestin qu'elle passe dans les puits où sa proportion est parfois 50 fois plus grande que la proportion normale. La chaux

a ici la même valeur diagnostique que le chlore dans les terrains volcaniques.

Le chlore provient lui aussi des écuries et des fumiers, et il y en a dans certains puits 50 fois plus que dans les eaux vierges, encore faut-il remarquer que ces dernières, lorsqu'elles circulent dans la nappe sous des sols non habités, mais cultivés, leur ont emprunté en les traversant un peu de la chaux et du chlore apportés par le fumier, ce dont on voit quelques exemples dans les villages aux environs de Montsalvy. Quand elles circulent sous les sols en friche ou couverts de bois, la chaux n'y dépasse pas, en terrain de gneiss, 1 mgr. et le chlore 3 mgr. par litre, tandis que dans l'eau des puits nous trouvons des chiffres de 107 mgr. de chaux et de 200 mgr. de sel marin. (N<sup>o</sup> 284, 275, 276, 283, 287, 288.)

2<sup>o</sup> Si grande qu'elle soit, la variation de la chaux et du sel marin n'est qu'une fraction assez faible de la variation du résidu d'évaporation, qui ne dépasse pas 40 mgr. en amont et en aval de la ville, tandis qu'il dépasse 600 mgr. dans les puits 283, 286 et 287. D'une manière générale, ce chiffre va en augmentant à mesure que l'on s'approche du centre de l'agglomération, et diminue quand on s'en éloigne.

Il y aurait eu là une étude intéressante à faire : chercher de quoi se compose, dans le résidu total, tout ce qui n'est ni de la chaux, ni du sel marin : silice (qui en fait la plus grande partie), matières organiques, sels ammoniacaux, nitrates, peut-être de l'urée.

Ces renseignements n'étaient pas faits pour plaire à ceux qui ne les demandaient pas, et je me suis abstenu de les fournir dans le détail. Je n'en dirai que ceci : les eaux du puits 288, creusé dans la cave d'une maison très sale, réduisent faiblement l'hypermanganate de potasse en solution acide ou alcaline. Elles ne contiennent pas d'ammoniaque, les nitrates y sont abondants et atteignent des chiffres compris entre 100 et 200 mgr. de potasse par litre. Dans un autre puits (291, 292) il m'est arrivé de les voir cristalliser, pendant l'évaporation d'un litre d'eau, au fond de la capsule.

3<sup>o</sup> On peut inférer de là que malgré toutes ces causes de pollution, le sol poreux et absorbant de la petite ville en protège les habitants à leur insu en nitrifiant, avant de la laisser arriver dans



le puits, la matière organique qui le traverse. Tel était au moins le cas après l'été pluvieux de 1897.

Pendant un été sec, la situation peut être meilleure, mais cet équilibre de nitrification n'est pas assez stable pour qu'on puisse compter sur lui. Nous venons de le voir troublé pour le puits n° 288 qui recevait de l'extérieur de la matière organique incomplètement transformée. On peut prévoir qu'il ne se réalisera pas constamment, dans tous les temps et dans tous les lieux, et que, par conséquent, les habitants sont toujours exposés à retrouver dans leur eau de boisson un peu de la matière organique et quelques-uns des microbes provenant de leur fumier et de leurs déjections.

4° En acceptant l'hypothèse la plus favorable, celle où la nitrification de la matière organique, garantissant son innocuité, serait toujours assurée, l'eau des puits n'en contiendrait pas moins, à côté des nitrates, tous les autres matériaux des excréments ou des fumiers que le sol ne retient pas : à savoir, le chlorure de sodium et les phosphates des urines : je ne parle pas, le cas échéant du bacille typhique.

Les eaux des puits que j'ai déjà étudiées atteignent à ce point de vue à un degré exceptionnel d'impureté. Il y en a qui sont sensiblement salées au goût, et la proportion moyenne d'acide phosphorique y atteint 25 mgr. par litre. C'est environ 50 fois plus que dans les eaux vierges de la région, qui en contiennent moins de 0 mgr. 5 par litre. C'est, d'un autre côté, 50 fois moins que dans l'urine.

5° Nous arrivons donc par différentes voies à cette conclusion : que l'eau des puits de Montsalvy était, après les pluies abondantes de 1897, un mélange d'un litre d'urine avec 50 litres d'eau de pluie. La proportion d'urine doit être plus considérable pendant les étés secs, parce que l'eau est plus rare. C'est aux intéressés de savoir s'ils admettent une compensation. On leur dit que c'est pour cela qu'ils se portent mal ; mais ils sont libres de ne pas l'admettre. En tout cas il est curieux de voir une population vivre et croître dans de pareilles conditions d'insalubrité. Il ne faut pas évidemment la prendre pour exemple. Un pareil milieu, acceptable pour ceux qui sont habitués, est mauvais pour qui le traverse ou s'y implante. Mais l'exemple de Montsalvy, et de beaucoup d'autres localités que je pourrais signaler dans le Can-



tal, si je ne craignais de m'y faire lapider, montre avec quelle puissance la nature travaille pour conserver les espèces, même celles qui ne se défendent pas.

Il ne faudrait pas croire non plus que le Cantal est le seul département de France qui fournisse des exemples pareils à ceux que nous venons de passer en revue. Montsalvy représente une petite ville un peu en retard sur son temps, mais qui s'est formée sur le même modèle que les autres: deux ou trois maisons qui se donnent rendez-vous autour d'un puits ou d'une source, auprès desquels de nouveaux groupements viennent s'agréger, en restant le plus possible fidèles aux habitudes prises en fait d'eau potable, jusqu'au moment où le puits ou la source sont devenus insuffisants ou se révèlent pollués. C'est ainsi que se forment les grandes villes, sans aller jamais bien vite dans la voie du progrès, et Paris lui-même, à l'époque où Boussingault a fait une campagne contre ses eaux de puits, était aussi une sale ville, qui s'alimentait en vertu de principes pareils à ceux que nous avons rencontrés à Montsalvy.

Je crois qu'il serait temps d'imiter partout l'exemple donné par Paris et les grandes villes, d'aller chercher de l'eau autre part que sur place, dans les régions habitées, pour l'amener pure et saine dans la ville ou le village. Seulement il faut pour cela qu'on puisse dire avec suffisamment d'assurance quel est pour chaque localité le secteur dans lequel il faut chercher. Et c'est pour cela qu'un travail fait en chaque département, analogue à celui que nous venons de faire pour le Cantal, rendrait des services.





